



UNICAMP

LUCY MARA CACIA FERREIRA LACERDA

**“OTIMIZAÇÃO DE SISTEMAS DE MICROALGAS PARA
MITIGAÇÃO DE CO₂ E PRODUÇÃO DE BIODIESEL”**

**“OPTIMIZATION OF MICROALGAE SYSTEMS FOR CO₂
MITIGATION AND BIODIESEL PRODUCTION”**

**CAMPINAS
2013**



UNICAMP

UNIVERSIDADE ESTADUAL DE CAMPINAS

FACULDADE DE ENGENHARIA QUÍMICA

LUCY MARA CACIA FERREIRA LACERDA

**“OTIMIZAÇÃO DE SISTEMAS DE MICROALGAS PARA
MITIGAÇÃO DE CO₂ E PRODUÇÃO DE BIODIESEL”**

Orientadora: Profa. Dra. Telma Teixeira Franco

**“OPTIMIZATION OF MICROALGAE SYSTEMS FOR CO₂
MITIGATION AND BIODIESEL PRODUCTION”**

Tese de Doutorado apresentada ao Programa de Pós
Graduação em Engenharia Química da Faculdade de Engenharia Química da
Universidade Estadual de Campinas para obtenção do título de Doutora em Engenharia
Química.

Doctorate thesis presented to the Chemical Engineering Postgraduation Programme of
the School of Chemical Engineering of the State University of Campinas to obtain the
Ph.D. grade in Chemical Engineering.

ESTE EXEMPLAR CORRESPONDE À VERSÃO FINAL DA TESE
DEFENDIDA PELA ALUNA LUCY MARA CACIA FERREIRA LACERDA
E ORIENTADA PELA PROFA. DRA. TELMA TEIXEIRA FRANCO

Assinatura da Orientadora

**CAMPINAS
2013**

Ficha catalográfica
Universidade Estadual de Campinas
Biblioteca da Área de Engenharia e Arquitetura
Rose Meire da Silva - CRB 8/5974

L116o Lacerda, Lucy Mara Cacia Ferreira, 1982-
Otimização de sistemas de microalgas para mitigação de CO₂ e produção de biodiesel / Lucy Mara Cacia Ferreira Lacerda. – Campinas, SP : [s.n.], 2013.

Orientador: Telma Teixeira Franco.
Tese (doutorado) – Universidade Estadual de Campinas, Faculdade de Engenharia Química.

1. Biocombustível. 2. Microalga. 3. Dióxido de carbono. 4. Fotossíntese. I. Franco, Telma Teixeira, 1957-. II. Universidade Estadual de Campinas. Faculdade de Engenharia Química. III. Título.

Informações para Biblioteca Digital

Título em outro idioma: Optimization of microalgae systems for CO₂ mitigation and biodiesel production

Palavras-chave em inglês:

Biofuel

Microalgae

Carbon dioxide

Photosynthesis

Área de concentração: Processos em Tecnologia Química

Titulação: Doutora em Engenharia Química

Banca examinadora:

Telma Teixeira Franco [Orientador]

Ana Teresa Lombardi

Francisco Maugeri Filho

Leonardo Brantes Bacellar Mendes

Ranulfo Monte Alegre

Data de defesa: 10-07-2013

Programa de Pós-Graduação: Engenharia Química

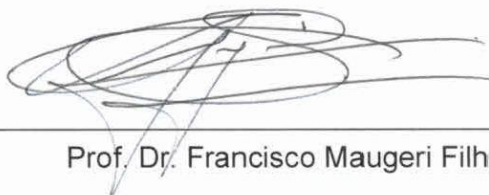
Tese de Doutorado defendida por Lucy Mara Cacia Ferreira Lacerda e aprovada em dia 10 de julho de 2013 para banca examinadora constituída pelos doutores:



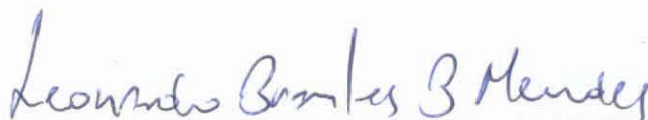
Prof^a. Dr^a. – Telma Teixeira Franco



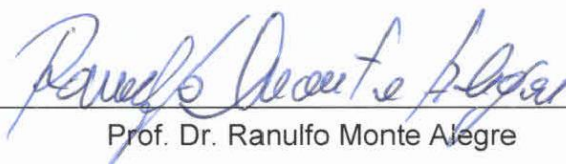
Prof^a. Dr^a. Ana Teresa Lombardi



Prof. Dr. Francisco Maugeri Filho

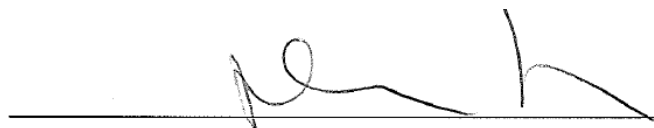


Prof. Dr. Leonardo Brantes Bacellar Mendes



Prof. Dr. Ranulfo Monte Alegre

Este exemplar corresponde à versão final da Tese de Doutorado em Engenharia Química defendida pela aluna Lucy Mara Cacia Ferreira Lacerda e aprovada pela Comissão Julgadora em 10 de julho de 2013.

A handwritten signature in black ink, consisting of a series of loops and a long horizontal stroke, positioned above a solid horizontal line.

Profª. Drª. – Telma Teixeira Franco

**Aos meus pais que sempre me apoiaram e
fizeram de mim o que sou hoje.**

Dedico

AGRADECIMENTOS

A Deus por sempre iluminar meu caminho e ajudar a enfrentar os obstáculos.

Aos meus pais, Sônia Maria Cacia Lacerda e Adilson Ferreira Lacerda pelo esforço, trabalho, exemplo, apoio incondicional e por sempre alegrarem meus dias.

À professora Dr. Telma Teixeira Franco pelas oportunidades proporcionadas e excelente orientação.

Ao professor Dr. Jeremy Woods pela experiência.

À minha irmã, Lucy Hélène Cacia Ferreira Lacerda, pelo carinho.

À Rosângela Pedroz pela ajuda nos momentos de dificuldade e pela amizade.

Aos amigos Carlos Henrique Gimenes Scoparo, José Francisco Sanches Moura e Rodrigo Carvalho Mori por continuarem fazendo parte da minha vida e sempre de uma maneira muito especial.

Ao amigo Douglas Mendes pela presença em todos esses anos de viagens Jundiaí-Campinas sempre com bons conselhos, ótimas dicas de compras e pela amizade.

Aos amigos londrinos Cintia Miranda, Thais Callegari Fernandes, Rafael Silvério Laurelli, Fernando Burgues Garcia, Nazieh El-Awamleh Hussein, Baptiste Savary, Tony Colomer Salva, Fran Cesco, Bruno Rodriguez Alvarez pelas incríveis experiências na terra da rainha.

Aos amigos do CEP - Imperial College London, Alexandre Strapasson, Nicole Kalas, Mireille Rack, Arturo Castillo, Frank Rosillo-Calle e Rocio Dias Chavez pela ajuda e experiência.

Aos amigos Edison Totumo Kato Junior, Erika Marques Reis, Maricy Bonfá, Michelle Abreu Cunha Xavier, Ruth Veronica Sierra pelos longos dias no laboratório.

Aos colegas do LEBBPOR e aos funcionários da FEQ pela cooperação.

À FAPESP, CNPQ, CAPES E PETROBRAS pelo suporte financeiro.



Government of the United Kingdom, 1939

*"It is our choices...
that show what we truly are,
far more than our abilities"*
J. K. Rowling, 1999

Resumo

O uso de microalgas em processos de mitigação ambiental e produção de energia renovável vêm ganhando destaque, mas a otimização das etapas de “upstream” e “downstream” é essencial para que a viabilidade técnica e econômica seja alcançada e o processo implementado em escala industrial. As condições que maximizam o crescimento celular, a mitigação de CO₂, o acúmulo de lipídios e proporcionam um perfil de ácidos graxos, compatível com a produção de biodiesel de elevada qualidade, foram avaliados em função de diferentes temperaturas (18-42 °C), disponibilidade de carbono na forma de CO₂ (ar-40%), disponibilidade de luz (4-192 μmol.m⁻².s⁻¹) e disponibilidade de nitrogênio na forma de NaNO₃ (0,25-1,00 g.L⁻¹). A recuperação da biomassa a partir do processo de floculação foi avaliada em função do tipo de floculante (orgânico e inorgânico), dose do floculante (0,005-0,300 g.L⁻¹), pH (4-11) e concentração celular (0,1-1,0 g.L⁻¹). As condições de cultivo selecionadas foram: 108 μmol.m⁻².s⁻¹, 26,5 °C, 0,25 g.L⁻¹ de NaNO₃ e 8,05 % de CO₂, sendo obtidos os seguintes resultados: $X_{\max}/X_0=14,78$ (razão da concentração celular máxima pela concentração inicial); $\mu_{\max}=1,02 \text{ d}^{-1}$ (máxima velocidade específica de crescimento); $\lambda=0,50 \text{ d}$ (duração da fase lag); $P_{\max}=0,58 \text{ g.L}^{-1}.\text{d}^{-1}$ (produtividade máxima); $P_{\text{mean}}=0,31 \text{ g.L}^{-1}.\text{d}^{-1}$ (produtividade média); $CB_{\max}=1,06 \text{ g.L}^{-1}.\text{d}^{-1}$ (Máxima taxa de incorporação de carbono); $CB_{\text{mean}}=0,55 \text{ g.L}^{-1}.\text{d}^{-1}$ (média da taxa de incorporação de carbono); 50% de lipídios e 90% dos FAMES (ésteres metílicos de ácidos graxos) correspondendo aos principais FAMES do biodiesel (C16:0, C18:0, C18:1, C18:2 e C18:3). A predição da qualidade do biodiesel produzido a partir do óleo de microalga forneceu os seguintes resultados: CN=56 (número de cetano), CFPP = 0,8 °C (ponto de entupimento de filtro a frio), $\rho = 863 \text{ kg/m}^3$ (densidade), $II = 97 \text{ g}_{I_2}/100\text{g}$ (índice de iodo), $\Delta H_C = 39,2 \text{ kJ/g}$ (calor de combustão), OSI = 13,8 h (índice de estabilidade oxidativa), e $\mu = 3,93 \text{ mm}^2.\text{s}$ (viscosidade) estando dentro dos valores especificados pelas normas ANP255/2003, EN14213-14214 e ASTM6751. As condições para eficiências de recuperação (RE) da biomassa superiores a 95% foram: intervalos de pH 4,0 à 11,0 (floculante orgânico); 5,0 à 7,0 (FeCl₃) e de 7,0 a 8,0 (Al₂(SO₄)₃); razão de $g_{\text{floculante}}/g_{\text{biomassa}}$ de: 0,08g_{orgânico}/g_{biomassa}, 0,40g_{Al2(SO4)3}/g_{biomassa}. O impacto da disponibilidade de luz no

interior de fotobiorreatores foi estimada para diferentes disponibilidades de luz ($108\text{-}700\ \mu\text{mol.m}^{-2}.\text{s}^{-1}$) e a partir de dados de concentração celular, concentração de pigmentos e geometria do reator, sendo verificada a perda de aproximadamente 85% da luz disponível na superfície para cultivos com concentração celular de até $2\ \text{g.L}^{-1}$ em fotobiorreatores de 8 cm de diâmetro. A produção de biomassa e biocombustíveis em software comercial SuperPro designer v8.5 foi simulada e associada a análise econômica.

Palavras-chave: biocombustível, microalga, dióxido de carbono, fotossíntese.

Abstract

The use of microalgae in environmental carbon dioxide mitigation processes and renewable energy production are gaining attention, but the optimization of “upstream” and “downstream” process is essential to promote technical and economic feasibility and make with the industrial scale became true. The conditions that maximize biomass growth, carbon dioxide mitigation, lipid content, and produce a fatty acid profile suitable for a high quality biodiesel was evaluated as function of different temperatures (18-42 °C), carbon availability as CO₂ (air-40%), light intensity (4-192 μmol.m⁻².s⁻¹), and nitrogen availability as NaNO₃ (0.25-1.00 g.L⁻¹). Biomass harvesting using flocculation process was evaluated as function of flocculant type (organic and inorganic), flocculant dosage (0.005-0.3 g.L⁻¹), pH (4-11), and biomass concentration (0.1-1.0 g.L⁻¹). The selected conditions were: 108 μmol.m⁻².s⁻¹, 26.5 °C and 8.05% de CO₂, with the following results: $X_{\max}/X_0=14.78$ (maximum and initial cell concentration ratio); $\mu_{\max}=1.02$ d⁻¹ (maximum specific growth rate), $\lambda=0.50$ d (lag phase duration); $P_{\max}=0.58$ g.L⁻¹.d⁻¹ (maximum productivity); $P_{\text{mean}}=0.31$ g.L⁻¹.d⁻¹ (mean productivity); $CB_{\max}=1.06$ g.L⁻¹.d⁻¹ (maximum carbon incorporation rate); $CB_{\text{mean}}=0.55$ g.L⁻¹.d⁻¹ (mean carbon incorporation rate); 50% of lipid content, and 90% of samples FAMES (fatty acid methyl ester) corresponding to the mainly biodiesel FAMES (C16:0, C18:0, C18:1, C18:2 e C18:3). Biodiesel quality prediction using samples of microalgae oil show the following results: CN=56 (cetane number), CFPP = 0.8 °C (could filter plugging point), $\rho = 863$ kg/m³ (density), II = 97 g_{I2}/100g (iodine index), $\Delta\text{HC} = 39.2$ kJ/g (heat of combustion), OSI = 13.8 h (oil stability index), and $\mu = 3.93$ mm².s (viscosity), and the values were compatible with different quality standards ASTM-D6751, EN14214/14213, and ANP 255/2003. Recovery efficiency (RE) of 95% or more can be obtained with pH 4,0 to 11,0 (organic flocculant); 5,0 to 7,0 (FeCl₃), and 7,0 to 8,0 (Al₂(SO₄)₃; $g_{\text{flocculant}}/g_{\text{biomass}}$ of: 0,08g_{organic}/g_{biomass}, 0,40g_{Al2(SO4)3}/g_{biomass}). The impact of light availability in the center of photobioreactor was predicted as function of cell concentration, pigments concentration and photobioreactor design, being observed approximately 85% of loss in the incident light availability in cultures is less than 2 g.L⁻¹. Biomass production process and biofuels

production process were simulated using a commercial software SuperPro Designer v8.5 followed by economic analysis.

Keywords: biofuel, microalgae, carbon dioxide, photosynthesis.

Conteúdo

Resumo	xv
Abstract.....	xix
CAPÍTULO 1.....	1
1. Introdução.....	3
2. Objetivos.....	4
2.1. Objetivo Geral	4
2.2. Objetivos Específicos.....	4
CAPÍTULO 2.....	7
1. Síntese bibliográfica	9
1.1 Biorrefinarias: Um novo conceito de aplicação de microalgas	9
1.2 Microalgas.....	10
1.3 Metabolismo e condições de cultivo.....	12
1.4 Métodos e sistemas de cultivo	16
1.5 Recuperação da biomassa	22
1.6 Geração de energia	25
1.7 Sistemas de extração/purificação dos produtos intracelulares	29
1.8 Produtos de origem de microalga	30
1.9 Comercialização da <i>Chlorella</i> sp.....	34
2. Referências	36
CAPÍTULO 3.....	45
1. Material & Métodos.....	47
1.1. Micro-organismo e meio de cultivo.....	47
1.2. Preparo do inóculo.....	47
1.3. Fotobiorreator e controle das condições experimentais.....	48
1.4. Ensaio realizado.....	50
1.4.1. Determinação das condições de cultivo	50
1.4.2. Impacto da disponibilidade de nitrogênio no cultivo da <i>Chlorella</i>	52
1.4.3. Avaliação da disponibilidade de luz no interior de fotobiorreatores.....	52
1.4.4. Separação da biomassa	52

1.5.	<i>Métodos analíticos</i>	55
1.5.1.	<i>Biomassa e pH</i>	55
1.5.2.	<i>Análise do perfil de lipídios</i>	56
1.5.3.	<i>Sedimentação da biomassa</i>	57
1.6.	<i>Avaliação dos parâmetros cinéticos</i>	57
1.6.1.	<i>Crescimento celular e produtividade</i>	57
1.6.2.	<i>Dióxido de carbono</i>	60
1.6.3.	<i>Análise de lipídios</i>	60
1.6.4.	<i>Disponibilidade de luz no interior do reator</i>	62
1.6.5.	<i>Recuperação da biomassa após a floculação</i>	62
2.	<i>Referencias</i>	63
CAPÍTULO 4		65
	<i>Statistical optimization of biomass growth and CO₂ mitigation: Effect of light intensity, temperature and CO₂ feeding</i>	67
	<i>Highlights</i>	67
	<i>Abstract</i>	67
1.	<i>Introduction</i>	68
2.	<i>Material and Methods</i>	69
2.1.	<i>Microalgae</i>	69
2.2.	<i>Culture system</i>	70
2.3.	<i>Optimizing the culture conditions</i>	70
2.4.	<i>Analytical methods</i>	71
2.5.	<i>Kinetic parameters analysis</i>	72
3.	<i>Results and discussions</i>	73
4.	<i>Conclusions</i>	85
5.	<i>Acknowledgement</i>	86
6.	<i>References</i>	86
CAPÍTULO 5		91
	<i>Nitrogen limitation improves fatty acid profile for biodiesel production: Prediction of quality properties</i>	93

<i>Highlights</i>	93
<i>Abstract</i>	93
1. <i>Introduction</i>	94
2. <i>Materials and Methods</i>	96
2.1. <i>Microalgae</i>	96
2.2. <i>Culture system</i>	96
2.3. <i>Experimental conditions</i>	97
2.4. <i>Biomass and pH dynamics</i>	97
2.5. <i>Lipid analysis</i>	98
2.6. <i>Direct transesterification</i>	98
2.7. <i>Fatty acid analysis</i>	98
2.8. <i>Biodiesel quality analysis</i>	99
2.9. <i>Kinetic parameter analysis</i>	101
2.9.1. <i>Cell growth</i>	101
2.9.2. <i>Lipid accumulation</i>	102
3. <i>Results and Discussion</i>	103
3.1. <i>Lipid profile and biodiesel quality</i>	103
3.2. <i>Biomass growth and lipid content</i>	108
4. <i>Conclusions</i>	112
5. <i>Acknowledgement</i>	113
6. <i>References</i>	113
CAPÍTULO 6	117
<i>Optimizing flocculation process to promote high biomass recovery efficiency</i>	119
<i>Highlights</i>	119
<i>Abstract</i>	119
1. <i>Introduction</i>	120
2. <i>Materials and Methods</i>	122
2.1. <i>Microalgae</i>	122
2.2. <i>Biomass production procedure</i>	122
2.3. <i>Biomass harvesting procedure</i>	123

2.4. Data analysis	125
3. Results and Discussion	125
3.1. Effect of pH	126
3.2. Effect of flocculant doses	127
3.3. Effect of cell concentration	129
3.4. General observations	130
4. Conclusions	133
5. Acknowledgments	133
6. References	134
CAPÍTULO 7	137
Impact of light availability in cell microalgae cultures	139
Highlights	139
Abstract	139
1. Introduction	140
2. Materials and Methods	141
2.1. Microalgae	141
2.2. Culture system	142
2.3. Operational conditions	142
2.4. Analytical methods	143
2.5. Data analysis	145
2.5.1. Cell growth	145
2.5.2. Pigment content and irradiance inside of the culture	146
2.5.3. Lipid accumulation and biodiesel quality	146
3. Results and Discussion	147
3.1. Cell growth	147
3.2. Pigment Content	148
3.3. Irradiance inside of the culture	150
3.4. Lipid analysis and biodiesel quality	153
4. Conclusions	155
5. Acknowledgement	155

6. References	155
CAPÍTULO 8.....	161
<i>Techno economic analysis of C. vulgaris production</i>	163
Highlights	163
Abstract.....	163
1. Introduction.....	164
2. Process description	165
3. Material & Methods.....	169
3.1. Process design	169
3.2. Economic analysis	173
4. Results and Discussions.....	175
4.1. Biomass production.....	175
4.2. Biofuels production.....	178
5. Conclusions	187
6. Acknowledgement	188
7. Reference	188
CAPÍTULO 9.....	193
Conclusões.....	195
CAPÍTULO 10.....	197
Sugestões para trabalhos futuros	199
CAPÍTULO 11.....	201
APENDICE.....	201
XVIII Congresso Brasileiro de Engenharia Química COBEQ, Foz do Iguaçu, 2010....	203
___Análise da viabilidade energético ambiental da conversão de dióxido de carbono por microalgas em fotobiorreatores	205
1 st Brazilian BioEnergy Science and Technology Conference BBEST, Campos do Jordão, 2011.....	213
___Photobioreactors: biomass production and CO ₂ mitigation.....	215
___From oil refinery to microalgal biorefinery.....	216
XVIII Congresso Brasileiro de Engenharia Química COBEQ, Búzios, 2012.....	217
___Modelagem de crescimento da microalga <i>Chlorella vulgaris</i>	219

35 th Symposium on Biotechnology for Fuels and Chemicals, SBFC, Portland, 2013 ..	229
___ Optimal coagulant doses to promote elevated biomass recovery efficiency	231
3 rd International Conference on Algal Biomass, Biofuels & Bioproducts, AlgalBBB, Toronto, 2013	233
___ Optimizing Microalgae Growth and CO ₂ Mitigation	235
___ Substrate inhibition of <i>Chlorella vulgaris</i> by acetate in heterotrophic culture	236
XIX Simpósio nacional de Bioprocessos _ SINAFERM, Foz do Iguaçu, 2013	237
___ Cultivo autotrófico x heterotrófico - parte 1: crescimento celular e acúmulo de lipídios.....	239
___ Cultivo autotrófico x heterotrófico – parte 2: Predição da qualidade do biodiesel ...	243
___ Produção de biodiesel a partir de microalgas e leveduras.....	247
___ Disponibilidade de luz no centro de fotobiorreatores	251
CAPÍTULO 12	255
ANEXO	255
Estado da arte do cultivo de microalgas no LEBBPOR	257

Índice de Figuras

Figura 1.1: Etapas do desenvolvimento de um processo produtivo em larga escala.....	5
Figura 2.1: Diferentes rotas metabólicas das microalgas.	12
Figura 2.2: Curva característica de crescimento celular em culturas do tipo batelada.....	16
Figura 2.3: Principais tipos de biorreatores.	19
Figura 2.4: Principais tipos de biorreatores construídos com plástico.	20
Figura 2.5: Principais técnicas para obtenção de energia a partir de biomassa de microalgas.	26
Figura 2.6: Rotas metabólicas de algas verdes para produção de biodiesel e bio-hidrogênio... ..	28
Figura 2.7: Processo de produção de biomassa.	34
Figura 2.8: Fotobiorreator de 600 m ³ produzindo <i>Chlorella</i> em Klötze, Alemanha.....	35
Figura 3.1: Diagrama do fotobiorreator.	49
Figura 3.2: Sequencia de experimentos conduzidos durante o trabalho.	50
Figura 3.3: Foto do equipamento Jar Test.	54
Figura 3.3: Imagem da planilha de cálculos para resolução do modelo Gompertz Modificado..	59
Figure 4.1: Cell concentration, biomass productivity and CO ₂ incorporation rate profiles of <i>C. vulgaris</i> cultured at different T, LI and %CO ₂	76
Figure 4.2: Surface response of growth parameters (X_{max}/X_0 ; μ_{max} ; λ ; P_{max} ; P_{mean}) and CO ₂ incorporation rate (CB_{max} ; CB_{mean}) as function of LI, T and %CO ₂	79
Figure 4.3: Surface response of desirability function to optimize simultaneously growth parameters (X_{max}/X_0 ; μ_{max} ; λ ; P_{max} ; P_{mean}) and CO ₂ incorporation rate (CB_{max} ; CB_{mean}) as function of LI, T and %CO ₂	82
Figure 4.4: Cell concentration, biomass productivity and CO ₂ incorporation rate profiles of <i>C. vulgaris</i> cultured at 26.5°C, 108 $\mu\text{mol.m}^{-2}.\text{s}^{-1}$, and 8.05 %CO ₂	84
Figure 5.1: Effects of FAME accumulation in the experiments with 0.25 g _{NaNO₃} .L ⁻¹ and 1.00 g _{NaNO₃} .L ⁻¹	104
Figure 5.2: Comparison of observed values (X_{obs}) and model predicted values (X_{pred}) of biomass concentration for different initial concentrations of NaNO ₃	109
Figure 5.3: Comparison of pH profile, biomass growth, and productivity.	110
Figure 6.1: Jar test with details of the analysis points.....	124
Figure 6.2: Images represents the beginning of the all tests realized before pH correction and flocculant addition.	126
Figure 6.3: Effect of flocculant addition in solution pH.....	127

Figure 6.4: Effect of pH in the recovery efficiency.	127
Figure 6.5: Effect of flocculant dosage in solution pH.....	128
Figure 6.6: Effect of flocculant dosage (g.L^{-1}) in the recovery efficiency.	128
Figure 6.7: Effect of cell concentration in the recovery efficiency.	129
Figure 6.8: Different flocs formed with the flocculant agents.	132
Figure 6.9: Change in the color of culture with excess of FeCl_3	133
Figure 7.1: Impact of light intensity on growth parameters.	148
Figure 7.2: Pigments profile during the experiments.	150
Figure 7.3: Light availability inside of the reactor during the experiments.....	152
Figure 7.4: Light availability inside of the reactor as function of biomass concentration.	152
Figure 8.1: Tubular reactor system at Algal PARC in Wageningen used as base for evaluate the dimensions of land for biomass production in this work.....	171
Figure 8.2: PFD of microalgal biomass production.	176
Figure 8.3: Impact of product price in the economic evaluation (2012 prices in \$).....	178
Figure 8.4A: Microalgal biodiesel production.....	180

Índice de Tabelas

Tabela 2.1: Comparação das refinarias de petróleo e biorrefinarias.	10
Tabela 2.2: Lista dos nutrientes necessários para células de microalgas e a estimativa da composição elementar de uma microalga.	13
Tabela 2.3: Fases de crescimento celular em cultivos em batelada.	17
Tabela 2.4: Vantagens e desvantagens entre reatores abertos e fechados.	18
Tabela 2.5: Comparação dos principais métodos de separação de microalgas.	23
Tabela 2.6: Pesquisa de biodiesel de microalga em sistemas fechados.	32
Tabela 2.7: Principais produtores de biodiesel de microalga em reatores abertos.	33
Tabela 2.8: Produtos obtidos a partir de biomassa de microalgas classificados em função do valor agregado.	31
Tabela 2.9: Principais dados sobre a <i>Chlorella vulgaris</i>	36
Tabela 3.1: Composição do meio sintético BBM (pH 6,8).	47
Tabela 3.2: Codificação das Variáveis do DCCR.	51
Tabela 3.3: Matriz Codificada do DCCR.	51
Tabela 3.4: Etapas dos ensaios de floculação.	53
Tabela 3.5: Modo de preparo das soluções de agente floculante.	54
Tabela 3.6: Condições experimentais dos ensaios de floculação.	54
Tabela 3.6: Parâmetros para análise de qualidade do Biodiesel.	61
Table 4.1: BBM synthetic medium composition (pH 6.8).	70
Table 4.2: Steps to perform a culture conditions optimization.	71
Table 4.3: Growth and carbon incorporation parameters analyzed with <i>C. Vulgaris</i> cultured with different T, LI, and %CO ₂	74
Table 4.4: Statistical analysis of CCRD results: effects estimates and p-values for X_{max}/X_0 ; μ_{max} ; λ ; P_{max} ; P_{mean} ; CB_{max} ; and CB_{mean}	77
Table 4.5: Analysis of variance (ANOVA) according to a CCDR.	77
Table 4.6: Model equations for X_{max}/X_0 ; μ_{max} ; λ ; P_{max} ; P_{mean} ; CB_{max} ; and CB_{mean}	78
Table 4.7: Estimation of critical values of the X_{max}/X_0 ; μ_{max} ; λ ; P_{max} ; P_{mean} ; CB_{max} ; and CB_{mean}	80
Table 4.8: Parameters used in Desirability approach.	81
Table 4.9: Factor levels and predicted responses of the Desirability function.	83
Table 4.10: Results of experimental model validation compared with model prediction data.	83
Table 5.1: BBM synthetic medium composition (pH 6.8).	96
Table 5.2: Prediction models for biodiesel quality properties.	100

Table 5.3: FAME profile of <i>Chlorella vulgaris</i>	103
Table 5.4: FAME properties obtained from sources in the literature.	105
Table 5.5: Predicted properties of <i>C. vulgaris</i> biodiesel.....	106
Table 5.6: Growth data on <i>C. vulgaris</i> in different experiments.	111
Table 6.1: BBM synthetic medium composition (pH 6.8).	122
Table 6.2: Biomass harvesting experimental conditions.	124
Table 6.3: Sedimentation images using flocculant best conditions.	131
Table 7.1: BBM synthetic medium composition (pH 6.8).	142
Table 7.2: Growth kinetic parameters in different light availabilities.....	148
Table 7.3: Pigment content of <i>C. vulgaris</i> cultured in different light availabilities.	149
Table 7.4: FAME profile of <i>C. vulgaris</i>	153
Table 7.5: Cetane number of each FAME obtained from sources in the literature.	154
Table 8.1: Microalgae products classified as function of commercial value	169
Table 8.2: Description of land requirement for biomass production.	171
Table 8.3: Lang factor for solid-fluid industries based in delivered equipment cost.	174
Table 8.4: Economic evaluation summary* (2012 prices in \$).	177
Table 8.5: Economic evaluation summary* (2012 prices in \$).	184
Table 8.6: Economic parameters as function of product price (2012 prices in \$).....	185

Nomenclatura

Abreviaturas

CCRD	Central composite rotatable design
DCCR	<i>Delineamento composto central rotacional</i>
FAME	Éster metílico de ácido graxo
Max	Valores máximos
ME	Metil éster
Mean	Média dos valores
Obs	Valores observados
PFD	Diagrama de fluxo de processo
Pred	Valores preditos pelos modelos
ROI	Return of Investment
RPM	Rotações por minuto
RSM	<i>Response surface methodology</i>
VVM	Vazão por volume por minuto

Siglas

A_{xxx}	Absorbancia a XXX nanometros	-
B, D	Parâmetros do modelo logístico	-
$C_{(c+x)}$	Concentração de carotenóides	$\mu\text{g.mL}^{-1}$ ou $\mu\text{g.g}^{-1}$
C_a	Concentração de clorofila 'a' na biomassa	$\mu\text{g.mL}^{-1}$ ou $\mu\text{g.g}^{-1}$
C_{atual}	Custo atual	R\$
CB	Taxa de carbono incorporado à biomassa	$\text{g.L}^{-1}.\text{d}^{-1}$
C_b	Concentração de clorofila 'b' na biomassa	$\mu\text{g.mL}^{-1}$ ou $\mu\text{g.g}^{-1}$
C_{base}	Custo base	R\$
C_C	Percentual de carbono na biomassa	%
$C_{X:Y}$	% do éster metílico $C_{X:Y}$	%
d_R	Diâmetro do reator	m
ER	Eficiencia de recuperação da biomassa	%
I_0	Intensidade luminosa na superfície do reator	$\mu\text{mol.m}^{-2}.\text{s}^{-1}$
I_{atual}	Índice atual	-
I_{av}	Intensidade luminosa no centro do reator	$\mu\text{mol.m}^{-2}.\text{s}^{-1}$

I_{base}	Índice base	-
I_{odo}	Índice de Iodo	$g_{I_2}/100g$
K_a	Coeficiente de extinção	$m^2.g^{-1}$
LI	Intensidade luminosa	$\mu mol.m^{-2}.s^{-1}$
Lub; Lub _{EM}	Lubricidade do biodiesel e do éster metílico	μm
MM; MM _{EM}	Massa molecular do biodiesel e do éster metílico	$g.mol^{-1}$
M_{CO_2} , M_C	Peso molecular do CO ₂ , peso molecular do Carbono	g
NC; NC _{EM}	Número de cetano do biodiesel e do éster metílico	-
OSI; OSI _{EM}	Índice de estabilidade à oxidação do biodiesel e do éster metílico	h
P	Produtividade	$g.L^{-1}.d^{-1}$
CFPP	Ponto de entupimento de filtro a frio	°C
T	Temperatura	°C
T	Tempo de residência	h
t_0 e t_2	Tempo de Residência no instante 0 e no instante 2	h
Tg	Tempo de geração	H
X_0 , X_{max} X	Concentração celular inicial, máxima e no tempo t	$mg.L^{-1}$
W_L	Massa seca de lipídios	g
W_X	Massa seca da biomassa	g
Símbolos Gregos		
λ	Duração da fase lag	h
μ , μ_{max}	Velocidade específica de crescimento, máximo valor de μ	h^{-1}
Θ	Ângulo da fonte de luz	°
ν ; ν_{EM}	Viscosidade cinemática do biodiesel e do éster metílico	$m^2.s^{-1}$
ρ ; ρ_{EM}	Densidade do biodiesel e do éster metílico	Kg/m^3
ΔHC ; ΔHC_{EM}	Calor de combustão do biodiesel e do éster metílico	$kJ.g^{-1}$

CAPÍTULO 1

INTRODUÇÃO E OBJETIVOS

1. Introdução

Em função da crise energética mundial e do aquecimento global, um combustível alternativo ao diesel de petróleo deve ser tecnicamente viável, economicamente competitivo, ambientalmente amigável e facilmente disponível, sendo o biodiesel uma das alternativas mais promissoras. A produção de biodiesel de microalgas aliada à produção de bioprodutos vem sendo considerada uma alternativa viável, mas ainda existem desafios (tecnológicos, econômicos, ambientais e sócio-políticos) que precisam ser abordados, para viabilizar a produção em escala industrial.

Assim, foram analisados alguns dos principais desafios tecnológicos, econômicos e ambientais da produção de biodiesel de microalga em biorrefinarias, em função das seguintes etapas de desenvolvimento de um processo industrial (Figura 1.1): i) informação bibliográfica, ii) pesquisa de bancada voltada à engenharia do processo, iii) definição do processo, e iv) viabilidade técnica e econômica preliminar.

O levantamento das informações bibliográficas sobre a produção de biomassa e bioprodutos de microalgas está apresentado no **Capítulo 2** contendo os itens: a) biorrefinarias, b) microalgas, c) metabolismo e condições de cultivo, d) métodos e sistemas de cultivo, e) recuperação da biomassa, f) geração de energia, g) sistemas de extração/purificação de bioprodutos, h) produtos de origem microalgal e i) comercialização da *Chlorella vulgaris*.

A pesquisa de bancada está detalhada nos Capítulos 3 a 7 que contém os materiais e métodos utilizados (**Capítulo 3**), a determinação das melhores condições de temperatura, disponibilidade de luz e % dióxido de carbono para a maximização da produção de biomassa de microalgas e mitigação de dióxido de carbono (**Capítulo 4**), avaliação do impacto da disponibilidade de nitrogênio no acúmulo de lipídios e no perfil de ácidos graxos, com foco na predição da qualidade do biodiesel (**Capítulo 5**), a maximização da separação da biomassa por floculação (**Capítulo 6**) e avaliação do impacto da disponibilidade de luz em cultivos de microalgas (**Capítulo 7**).

A definição das etapas processo e a análise técnico-econômica estão detalhadas no **Capítulo 8**. Estas etapas foram desenvolvidas com o auxílio do Dr. Jeremy Woods

no Imperial College London. O **Capítulo 9** contém as conclusões do trabalho, seguido pelas sugestões de trabalhos futuros (**Capítulo 10**) e apêndice (**Capítulo 11**) contendo os artigos/resumos publicados em congressos nacionais e internacionais durante o período do doutorado. Cabe comentar que, esses trabalhos foram escritos para viabilizar a comparação dos resultados de laboratório com outras áreas de pesquisa, como cultivos de cianobactérias, cultivos heterotróficos de microalgas e cultivos de leveduras. O estado da arte do cultivo de microalgas no laboratório LEBBPOR/FEQ/UNICAMP está descrito no **Capítulo 12**.

2. Objetivos

2.1. Objetivo Geral

Otimização de cultivos de microalgas para mitigação de dióxido de carbono e produção de biodiesel.

2.2. Objetivos Específicos

Determinar as melhores condições de cultivo da *C. vulgaris* com foco na produção de biomassa e mitigação de dióxido de carbono;

Determinar o impacto da disponibilidade de nitrogênio no acúmulo de lipídios e perfil de ácidos graxos;

Usar modelos de predição para estimar as principais propriedades do biodiesel obtido a partir do óleo da *C. vulgaris*;

Definir as melhores condições de floculação da biomassa para maximização da eficiência de recuperação;

Usar modelo de predição para verificar o impacto da geometria do reator, concentração celular e de pigmentos na disponibilidade de luz no interior de fotobiorreatores ao longo dos cultivos.

Simular o processo de produção de biomassa e biocombustíveis em software comercial SuperPro Designer v8.5;

Realizar a avaliação econômica preliminar dos processos simulados;

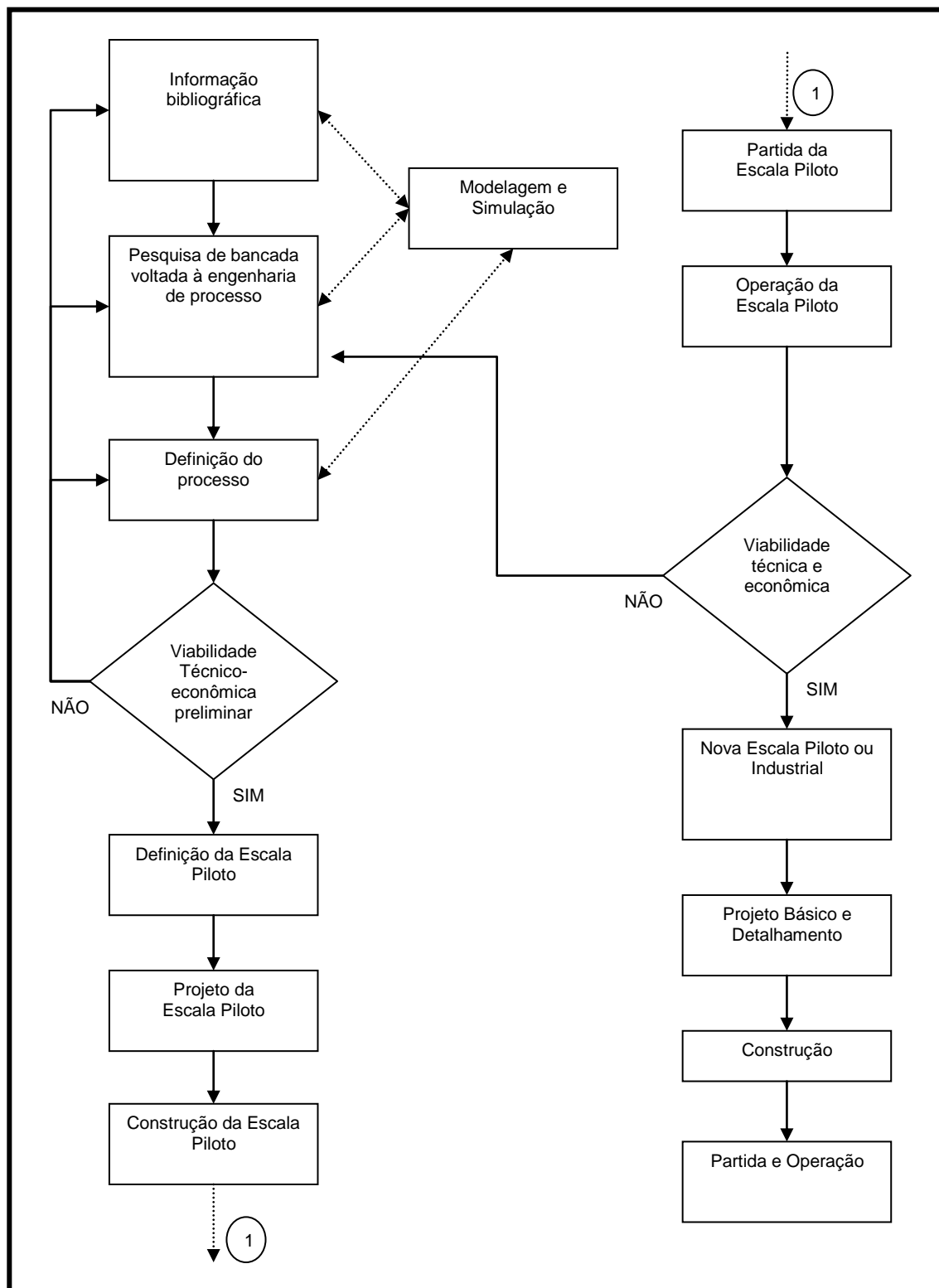


Figura 1.1: Etapas do desenvolvimento de um processo produtivo em larga escala.

Fonte: Schimidell *et al.*, Biotecnologia Industrial, 2005.

CAPÍTULO 2

SÍNTESIS BIBLIOGRÁFICA

1. Síntese bibliográfica

1.1 Biorrefinarias: Um novo conceito de aplicação de microalgas

Em 2008, o consumo anual de energia primária foi estimado em 11,3 milhões de toneladas de óleo equivalente, onde 88% são provenientes de combustíveis fósseis, 6% de energia nuclear e 5% de hidroelétricas (BRENNAN e OWENDE, 2010). A produção de energia está intrinsecamente relacionada com a vida humana, sendo que fontes renováveis e limpas podem atenuar as questões de sustentabilidade enfrentadas nos últimos anos, como a elevação dos gases do efeito estufa na atmosfera (SUBHADRA, 2010), considerada uma das principais causas do aquecimento global (YUN *et al.*, 1997).

Desde 1750 até 2011, a quantidade de CO₂ acumulada na atmosfera aumentou em 140% atingindo 390,9 ppm. Essa elevação da concentração foi 2 ppm (média) por ano nos últimos 10 anos (WMO, 2012). Nesse sentido, reduzir as emissões de dióxido de carbono é uma das metas para minimizar o impacto deste gás no efeito estufa (KUMAR *et al.*, 2011).

Existem três formas de reduzir as emissões de CO₂: i) reduzir a necessidade de geração de energia em função do aumento de eficiência dos equipamentos, ii) reduzir as emissões, utilizando fontes de combustíveis renováveis e limpas, iii) promover a mitigação de CO₂ a partir do desenvolvimento de tecnologias de seqüestro e captura de CO₂ (YANG *et al.*, 2008). Nesse sentido, a mitigação biológica de CO₂ a partir de microalgas atrai muita atenção (KUMAR *et al.*, 2011), visto que a produção de biomassa microalgal contribui com a bio-fixação de CO₂ (1 kg de biomassa seca necessita de aproximadamente 1,8 kg de CO₂) (RODOLFI *et al.*, 2009; ANJOS *et al.*, 2013) além de poder ser tratada e utilizada na geração de energia renovável como biodiesel, CH₄, H₂ e etanol (HO *et al.*, 2013; LAKANIEMI *et al.*, 2013; LEITE *et al.*, 2013; MAKAREVICIENE *et al.*, 2013).

Especialistas concordam que uma futura abordagem global deve adotar o conceito de biorrefinaria microalgal para mitigar dióxido de carbono ao mesmo tempo

em que a biomassa é utilizada na produção de energia renovável e de produtos de elevado valor agregado. Existem vários conceitos de Biorrefinarias, sendo o mais aceito o divulgado pelo NREL: “*Uma biorrefinaria integra processos e equipamentos de conversão de biomassa para produção de combustíveis, energia e produtos químicos de elevado valor agregado*”. Trata-se de um conceito análogo ao da refinaria de petróleo, como comparado na **Tabela 2.1** (ENERGY, 2012).

Tabela 2.1: Comparação das refinarias de petróleo e biorrefinarias.

	Refinaria de Petróleo	Biorrefinaria
Matéria Prima	Petróleo e gás natural	Biomassa
Localização/Quantidade em operação	Concentrada em áreas ricas em petróleo / Elevada	Bem distribuída / Reduzida
Viabilidade	Contínua (não renovável)	Sazonal ou contínua (renovável)
Processo produtivo	Otimizado por mais de 100 anos	Requer P&D
Qualidade dos produtos	Bem especificada e atende a demanda do mercado	Necessita ser padronizada

Fonte: (REE e ANNEVELINK, 2007).

1.2 Microalgas

Sob a denominação de microalgas estão incluídos organismos procarióticos e eucarióticos (MATA *et al.*, 2010). Os organismos procarióticos possuem aproximadamente $2,7 \cdot 10^9$ anos de história filogenética e são classificados em “Cyanophyta” e “Prochlorophyta”, já os eucarióticos contam com $1,9 \cdot 10^9$ anos sendo divididos em “Chlorophyta”, “Euglenophyta”, “Rhodophyta”, “Haptophyta”, “Heterokontophyta”, “Dinophyta” e “Cryptophyta” (PULZ e GROSS, 2004; DERNER *et al.*, 2006). São organismos morfologicamente diferentes, mas similares fisiologicamente (ABALDE, 1999), tendo se desenvolvido em condições ambientais extremas em bilhões de anos de evolução da atmosfera primitiva (RAJA *et al.*, 2008). Podem crescer em quase todos os ecossistemas existentes (LEE, 2008): água doce ou salgada, zonas

úmidas, gelo ou regiões muito quentes (AVALOS e MAIBACH, 2000; MATA *et al.*, 2010), podendo também colonizar habitats artificiais, e.g., fontes, barragens, reservatórios, piscinas, garrafas, pratos e vasos de plantas (BARSANTI e GUALTIERI, 2006).

Durante as últimas décadas, extensas coleções de microalgas foram criadas por pesquisadores em diferentes países (MATA *et al.*, 2010) e atestam a grande variedade de microalgas disponíveis e que podem ser utilizadas industrialmente. No quadro abaixo estão apresentadas algumas das coleções brasileiras de microalgas e cianobactérias cadastradas WDCM. Como alternativa, à compra de culturas em bancos de cepas, pode ser realizado o isolamento de cepas endêmicas, aproveitando a capacidade desses micro-organismos de crescer em condições ambientais locais.

Quadro 2.1: Coleções brasileiras de microalgas cadastradas no WDCM.

Sigla	WDCM	Nome da coleção
BCCUSP	WDCM 844	Coleção Brasileira de Cianobactérias – Universidade de São Paulo
BMBC	WDCM 910	Coleção Brasileira de Bactérias Marinhas
BR	WDCM 364	Centro de Recursos Biológicos Johanna Dobereiner
CBMAI	WDCM 823	Coleção Brasileira de Micro-organismos de Ambiente e Indústria
CCT	WDCM 885	Coleção de Culturas Tropical
CETESB	WDCM 714	Setor de Pesquisa Tecnológica de Sist. de Trat.de Efluentes Domésticos
CM-UFMG	WDCM 1029	Coleção de Micro-organismos, DNA e Células da UFMG
CPAC	WDCM 776	Cpac-Embrapa
CRM-UNESP	WDCM 1043	Central de Recursos Microbianos do Instituto de Biociências da UNESP
Fiocruz/CCBS	WDCM 947	Coleção de Culturas de Bactérias de Interesse em Saúde
FTI	WDCM 716	Centro de Biotecnologia e Química-CEBIQ
IAL	WDCM 282	Núcleo de Coleção de Micro-organismos
IEAPM	WDCM 727	Instituto de Estudos do Mar Almirante Paulo Moreira
IGESALQ	WDCM 902	Coleção Micro-organismos
IOUSP	WDCM 728	Coleção de culturas de microalgas marinhas
IPT	WDCM 721	Agrupamento de Biotecnologia
ITALSM	WDCM 723	Seção de Microbiologia
LGM-USP	WDCM 736	Depto de Microbiologia Lab. de Genética de Microrganismos
SMIP	WDCM 729	Seção de Maricultura
UFScarCC	WDCM 835	Coleção de culturas de microalgas de água doce

Fonte: http://www.wfcc.info/ccinfo/collection/col_by_country/b/55/

1.3 Metabolismo e condições de cultivo

As microalgas são capazes de obter energia a partir de diferentes metabolismos (**Figura 2.1**), sendo o metabolismo autotrófico o mais importante (RICHMOND, 2004). As microalgas autotróficas são capazes de produzir os compostos necessários para manutenção da vida sem necessitar de uma fonte de carbono orgânico, sintetizando suas moléculas orgânicas a partir de materiais inorgânicos (dióxido de carbono e sais) e energia solar (SIGEE, 2005; BRENNAN e OWENDE, 2010). As microalgas fotoautotróficas são aquelas que necessitam unicamente de fontes inorgânicas, já as que crescem unicamente na presença de luz são conhecidas como fotoautotróficas obrigatórias (RICHMOND, 2004). Para o metabolismo auxotrófico, existe a necessidade de pequenas quantidades de compostos orgânicos, como vitaminas e aminoácidos (RICHMOND, 2004). As microalgas heterotróficas, por sua vez, necessitam de uma fonte de carbono orgânico para manutenção da vida e as microalgas fotoheterotróficas necessitam de luz como fonte de energia para utilizar carbono orgânico (RICHMOND, 2004).

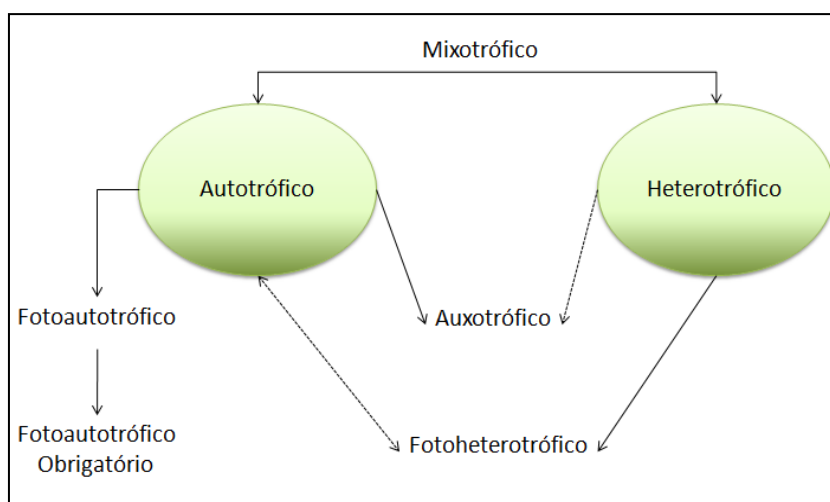


Figura 2.1: Diferentes rotas metabólicas das microalgas.

Fonte: (RICHMOND, 2004).

Cabe comentar que, algumas microalgas utilizam apenas um tipo de metabolismo para promover o crescimento, já outras podem alternar entre essas rotas metabólicas, mas tendem a exibir melhor crescimento em um dos modos (RADMER, 1996).

O carbono é o principal constituinte da célula podendo ser obtido a partir de fontes inorgânicas (CO_2 , HCO_2^{-3} , CO^{-3}) e orgânicas (hexoses, pentoses, etc.). Após a fonte de carbono, o nitrogênio é o elemento mais importante, estando relacionado com a produção de ácidos nucleicos e proteínas e diretamente associado ao metabolismo primário (RICHMOND, 2004). Fósforo é o terceiro elemento mais importante para o crescimento das microalgas, necessitando ser adicionado em excesso, pois nem todos os compostos de fósforo são facilmente assimiláveis pelas células. Além desses elementos, metais traço também devem ser adicionados ao cultivo, como Mg, Ca, Mn, Zn, Cu e Mb (KUMAR, A. *et al.*, 2010). A **Tabela 2.2** relaciona os principais nutrientes com a composição elementar presente nas células das microalgas (RICHMOND, 2004).

Tabela 2.2: Lista dos nutrientes necessários para células de microalgas e a estimativa da composição elementar de uma microalga.

Elemento	Compostos	Unidades de medida/L _{meio}	Intervalo de composição na célula ($\mu\text{g}/\text{mg}_{\text{massa seca}}$)
C	CO_2 , HCO_2^{-3} , CO^{-3} , Moléculas orgânicas	g	175–650
O	O_2 , H_2O , Moléculas orgânicas	g	205–330
H	H_2O , Moléculas orgânicas, H_2S ,	g	29–100
N	N_2 , NH_4^+ , NO_3^- , NO_2^- , aminoácidos, uréia	g	10–140
Na	Sais inorgânicos, i.e., NaCl , Na_2SO_4 , PO_4	g	0,4–47
K	Sais inorgânicos, i.e., KCl , K_2SO_4 , K_3PO_4	g	1–75
Ca	Sais inorgânicos, i.e., CaCO_3 , Ca^{2-}	g	0,0–80
P	Sais inorgânicos, fosfatos de Na ou K	g	0,5–33
S	Sais inorgânicos, $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$, aminoácidos	g	1,5–16
Mg	Sais inorgânicos, Co_2^{-3} , SO_4^{-2} , ou sais de Cl^-	g	0,5–75
Fe	FeCl_3 , $\text{Fe}(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$, citrato de ferro	mg	0,2–34
Zn	SO_4^{-2} ou sais de Cl^-	mg	0,005–1,0
Mn	SO_4^{-2} ou sais de Cl^-	mg	0,02–0,24
Si	$\text{Na}_3\text{SiO}_3 \cdot 9\text{H}_2\text{O}$	mg	0–230
B	H_3BO_3	mg	0,001–0,25

Fonte: (RICHMOND, 2004).

Os meios de cultivo devem fornecer os nutrientes necessários para a manutenção e propagação das células. Basicamente existem dois grandes grupos de meios de cultivo, ou seja, meios sintéticos e meios complexos. Chamam-se sintéticos os meios cuja composição química é qualitativa e quantitativamente conhecida. Os meios complexos são aqueles que apresentam um composto cuja composição química não é perfeitamente definida, como peptonas, extrato de levedura, dentre outros (SCHIMIDELL *et al.*, 2005).

Para a propagação das cepas, as condições de cultivo devem ser semelhantes ao ambiente natural do micro-organismo. No cultivo, assim como no ambiente natural, o crescimento desses micro-organismos é resultado da interação entre fatores biológicos, físicos e químicos (RAVEN *et al.*, 2001; SHEN *et al.*, 2009). Os fatores biológicos estão relacionados às próprias taxas metabólicas da espécie cultivada, bem como com a possível influência de outros organismos sobre o desenvolvimento das células. Quanto aos fatores físico-químicos, são principalmente estudadas a temperatura, pH, salinidade, disponibilidade de nutrientes e iluminação (DERNER *et al.*, 2006).

Temperatura: Um dos parâmetros mais críticos a serem controlados (RICHMOND, 2004; WANG e ZHONG, 2007), por influenciar os processos celulares afetando a floração, capacidade fotossintética, crescimento e respiração das microalgas (ROBARTS e ZOHARY, 1987). Ela deve ser mantida abaixo de 10 °C para organismos polares, entre 10 e 25 °C para os originados em clima temperado e superior a 20 °C para os de clima tropical. Usualmente cultivos de microalgas suportam temperaturas entre 16 e 37 °C, sofrendo redução de atividade em temperaturas menores que 16 °C e ocorrendo morte celular em cultivos com temperatura superior a 37 °C (BARSANTI e GUALTIERI, 2006).

Luz: Fundamental no crescimento de microalgas (ROBARTS e ZOHARY, 1987) agindo como a principal fonte de energia por induzir a atividade enzimática e influenciar a síntese protéica (BERTOLDI *et al.*, 2008). Tanto a quantidade quanto a qualidade da fonte luminosa afetam a taxa de crescimento celular. A fonte de luz pode ser natural ou artificial por meio de lâmpadas fluorescentes. Na maioria das vezes

devem ser empregadas luminosidades entre 100 e 200 $\mu\text{mol.m}^{-2}.\text{s}^{-1}$ (7400 e 14800lux, respectivamente) o que corresponde a cerca de 5-10% da luz plena do dia (2000 $\mu\text{mol.m}^{-2}.\text{s}^{-1}$, ou seja, 148000 lux).

Cultivos “outdoor” estão expostos a variações cíclicas dos níveis de radiação solar, ou seja, o ciclo de luz dia/noite e a duração dos períodos de radiação solar em função das estações do ano (MOLINA *et al.*, 2001). A atividade fotossintética é fortemente influenciada pela variação da radiação solar durante o dia, ou seja, entre as 8:00 e 12:00 a atividade fotossintética aumenta em função do aumento da radiação solar, das 12:00 as 14:00 a radiação solar é intensa e a cultura sofre fotoinibição, das 14:00 as 16:00, a atividade fotossintética diminui com a queda da radiação solar (MOLINA *et al.*, 2001). A intensa exposição à luz solar somada ao acúmulo de oxigênio dissolvido também pode causar foto-oxidação gerando morte celular (MIRÓN *et al.*, 1999).

pH: A maior parte das espécies de microalgas é favorecida por pH neutro, contudo, alguns gêneros como a *Spirulina* e a *Chlorococcum* conseguem suportar valores de pH 9,0 e 4,0, respectivamente. O equilíbrio químico CO_2 , HCO_3^- e H_2CO_3 gera uma relação complexa entre pH e disponibilidade de CO_2 dissolvido no meio de cultivo, sendo diretamente relacionado à produtividade de biomassa e manutenção do pH em cultivos autotróficos (KUMAR, AMIT *et al.*, 2010). O completo colapso de uma cultura pode ocorrer se a manutenção do pH não for eficiente.

Salinidade: As microalgas marinhas podem ser capazes de tolerar mudanças na condição de salinidade, sendo que a maioria exibe melhor crescimento celular em condições ligeiramente inferiores ao de seu habitat natural (BARSANTI e GUALTIERI, 2006).

Aeração: Necessária para evitar a aglomeração e sedimentação das microalgas, sendo também responsável por melhorar as trocas gasosas e a exposição aos nutrientes e a luz. Dependendo da escala do sistema de cultivo, esse parâmetro pode ser resultado da aeração diária por meio de agitação manual (tubos de ensaio), aeração por borbulhamento ou aeração mecânica (BARSANTI e GUALTIERI, 2006). Trata-se de um parâmetro chave no aumento de eficiência dos biorreatores. Uma

agitação insuficiente pode promover a sedimentação da biomassa ou pontos de estagnação, onde a disponibilidade de luz e nutrientes será limitante. Contudo, elevadas taxas de agitação podem provocar cisalhamento e danos às células, além de necessitar de grande quantidade de energia (KUMAR, AMIT *et al.*, 2010).

1.4 Métodos e sistemas de cultivo

O método de cultivo de microalgas mais comum é o cultivo em batelada devido a sua simplicidade e baixo custo de operação (RICHMOND, 2004). Neste tipo de processo não existe entrada ou saída de células, nutrientes ou produtos, ou seja, os recursos do processo são finitos. A concentração celular aumenta até a exaustão do nutriente limitante, a concentração dos nutrientes diminui e a dos produtos aumenta com o tempo (BORZANI *et al.*, 2001; SCHMIDELL *et al.*, 2001; CHISTI e MOO-YOUNG, 2003; CINAR, 2003). As propriedades das células (tamanho, composição e funções metabólicas) variam consideravelmente entre as fases de crescimento que estão detalhadas na **Figura 2.2** e **Tabela 2.3**.

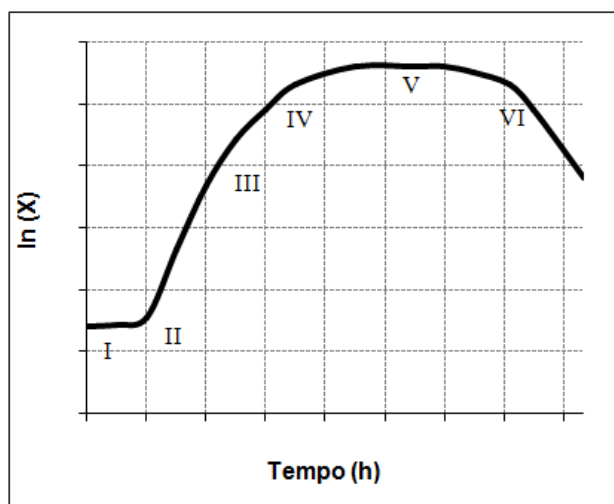


Figura 2.2: Curva característica de crescimento celular em culturas do tipo batelada.

Fonte: (SCHMIDELL *et al.*, 2001).

Tabela 2.3: Fases de crescimento celular em cultivos em batelada.

Crescimento	Descrição
1 - Lag	Período de adaptação que ocorre após a inoculação e em função de diversos fatores, como idade da célula e estágio de adaptação. Para culturas inoculadas em crescimento exponencial esse período tende a ser breve e para culturas inoculadas da fase sólida para a líquida esse período tende a ser longo.
2 - Aceleração ($\mu < \mu_{\max}$)	Período de aceleração do crescimento celular que termina com toda a população se dividindo num intervalo regular de tempo.
3 - Exponencial ($\mu = \text{cte} = \mu_{\max}$)	Período de grande interesse, pois o crescimento celular ocorre exponencialmente e a máxima taxa de crescimento é obtida.
4 - Desaceleração ($\mu < \mu_{\max}$)	Período de desaceleração do crescimento celular em função de fatores que podem incluir a exaustão dos nutrientes, fotolimitação pelo auto-sombreamento (aumento da densidade celular provoca a redução da quantidade de luz disponível); auto-inibição pelos metabólitos excretados que podem ter um efeito inibitório ao crescimento.
5 – Estacionária	Período em que a máxima concentração celular é atingida.
6 - Morte celular ($\mu < 0$)	Período final do cultivo que é caracterizado por uma taxa de crescimento negativa. Durante essa fase a qualidade da água se deteriora principalmente devido ao acúmulo de catabólitos e os nutrientes são esgotados. A densidade celular diminui rapidamente e entra em colapso.

Fonte: (SCHMIDELL *et al.*, 2001; RICHMOND, 2004).

Outro método de cultivo é o cultivo em regime contínuo, que possui recursos infinitos visto que as culturas são mantidas em um ponto escolhido, sobre a curva de crescimento. Neste tipo de processo, um volume determinado de meio de cultura é adicionado automaticamente, a uma taxa proporcional à taxa de crescimento do micro-organismo, ao mesmo tempo em que um volume igual de cultura é retirado. Trata-se do método que pode ser dividido em duas categorias, turbidostato e chemostato. Na primeira categoria o meio de cultura fresco só é adicionado no momento em que a densidade celular atinge um ponto pré-determinado. Na segunda categoria, o fluxo de adição do meio de cultura é constante e determinado. As desvantagens compreendem o custo relativamente elevado e a complexidade de operação (SCHMIDELL *et al.*, 2001; CHISTI e MOO-YOUNG, 2003; CINAR, 2003; RICHMOND, 2004).

Sistemas de cultivo de microalgas, em larga escala, tiveram início antes da metade do século XX (GREENWELL *et al.*, 2009), podendo ser realizados em *raceways* ou em fotobiorreatores. *Raceways* consistem tipicamente em circuitos

independentes de recirculação com agitação promovida por uma roda de pás. As dimensões dos *raceways* normalmente variam de 20 a 30 cm de profundidade com aproximadamente 0,5 a 1 ha (GREENWELL *et al.*, 2009). Embora seja uma configuração de fácil operacionalidade, as produtividades são baixas, tornando-se viável comercialmente apenas para compostos de elevado valor (TRAVIESO *et al.*, 2001; SIERRA *et al.*, 2008). Por outro lado, fotobiorreatores são caracterizados por elevadas eficiências fotossintéticas associadas à maior precisão e controle das variáveis operacionais, menor risco de contaminação e minimização das perdas de água por evaporação (MUÑOZ e GUIEYSSE, 2006; JACOB-LOPES, 2007; MORAIS e COSTA, 2007). As principais diferenças entre essas duas configurações estão dispostas na **Tabela 2.4** (BOROWITZKA, 1999; MOLINA GRIMA *et al.*, 1999; GROBBELAAR, 2009). A **Figura 2.3** apresenta os principais tipos de biorreatores existentes e a **Figura 2.4** os lançamentos de reatores construídos em plástico.

Tabela 2.4: Vantagens e desvantagens entre reatores abertos e fechados.

Parâmetro	Reator Aberto	Reator Fechado
Risco de contaminação	Elevado	Baixo
Perda de água por evaporação	Elevado	Baixo
Perda do CO ₂ alimentado	Elevado	Baixo
Reprodutibilidade	Variável	Possível
Controle do Processo	Complicado	Menos Complicado
Padronização	Difícil	Possível
Dependência com as chuvas	Dependente	Independente
Manutenção	Fácil	Difícil
Concentração da Biomassa	Baixa	Elevada
Custo de Produção	Baixo	Elevado
Eficiência Fotossintética	Baixa	Elevada
Área necessária	Elevada	Baixa

Fontes: (BOROWITZKA, 1999; MOLINA GRIMA *et al.*, 1999; GROBBELAAR, 2009)



Raceway



Tanque circular



Tanque retangular



Tipo cerca vertical



Tipo cerca horizontal



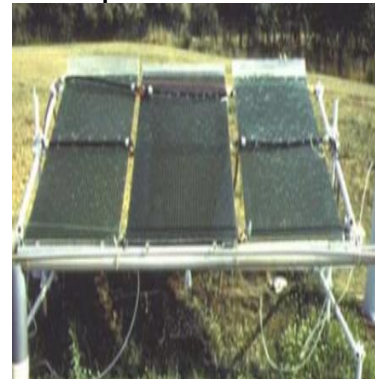
Tipo cerca inclinado



Vertical



Horizontal



Placas paralelas inclinado



Placas paralelas vertical

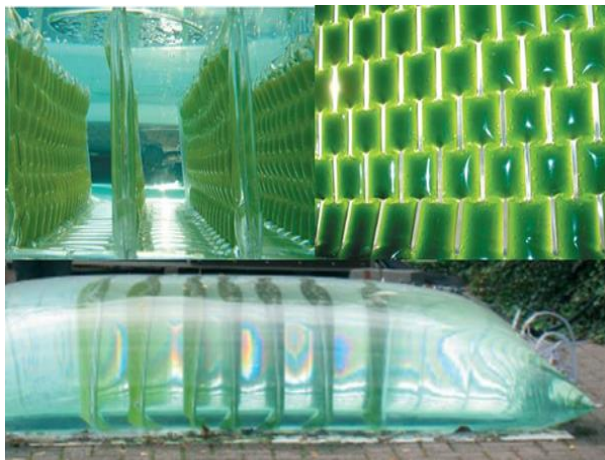
Figura 2.3: Principais tipos de biorreatores.
Fonte:(SHEN *et al.*, 2009).



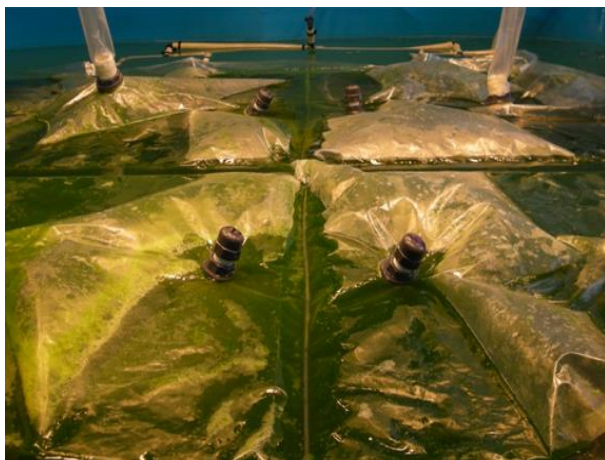
(<http://engineeringnews.co.za/article/algae-biofuel-project-for-africa-kicks-off-in-eastern-cape-2009-03-20>)



(<http://spectrum.ieee.org/energy/renewables/betting-on-algal-biofuels/2>)

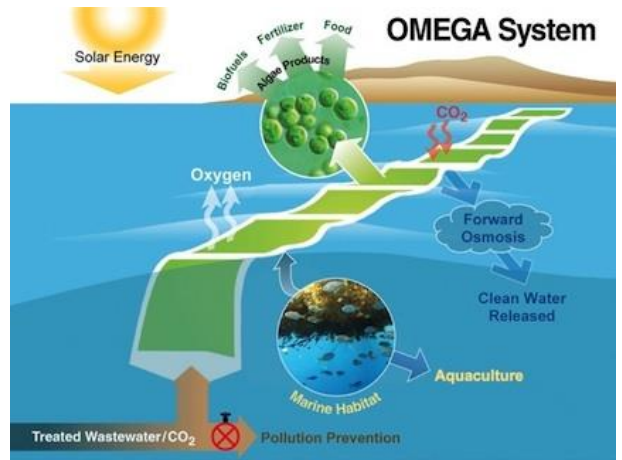


Provion (www.provion.com)



Algasol Renewables

(<http://www.algaeindustrymagazine.com/low-cost-algae-production-is-it-finally-with-us/>)



Nasa

(<http://www.nasa.gov/centers/ames/news/releases/2009/09-147AR.html>)

Figura 2.4: Principais tipos de biorreatores construídos com plástico.

A partir da década de 80, fotobiorreatores passaram a ser considerados uma alternativa promissora aos tanques abertos, ganhando relevância em projetos desenvolvidos no Japão (HIRATA *et al.*, 1996; KAJIWARA *et al.*, 1997; MURAKAMI e IKENOUCHI, 1997). Posteriormente, inúmeros grupos de pesquisa em diversos países visaram elucidar a aplicabilidade destes sistemas na conversão de CO₂ em biomassa (ONO e CUELLO, 2007; JACOB-LOPES *et al.*, 2008), sendo que essa investigação se concentra principalmente em duas áreas: os gases de combustão (normalmente com 10-20% CO₂) e ar em um espaço fechado (geralmente não mais que 1% de CO₂) (CHENG *et al.*, 2006).

Dentre as configurações mais usadas de fotobiorreatores estão os tubulares (coluna de bolhas e *airlift*). Ambos operam sem agitação mecânica, sendo a mistura atingida em função da injeção de gás por borbulhamento. O reator do tipo coluna de bolhas é basicamente um tanque cilíndrico com um distribuidor de gás na base sendo intensamente utilizado em reatores multifásicos químicos, petroquímicos, bioquímicos e biotecnológicos (KANTARCI *et al.*, 2005). Reatores “*airlift*”, por sua vez, contam com um tubo concêntrico para promover a recirculação dos gases dentro do reator, devido a diferença de densidade da seção aerada de fluxo ascendente, “*riser*”, e a seção não aerada de fluxo descendente, “*downcomer*” (SIEGEL *et al.*, 1994; RAO *et al.*, 1997). Além dessas principais configurações, outras também vêm sendo propostas, o que inclui geometria retangular, piramidal, cônica e esférica (STEWART e HESSAMI, 2005).

O levantamento cinético de fotobiorreatores em escala de bancada é a etapa inicial para o desenvolvimento desses processos em larga escala, visto que os requerimentos energéticos do reator irão depender, primariamente, da geometria.

Sistemas completos de fotobiorreatores normalmente contem um sistema de reatores, um sistema de iluminação, um sistema de trocas gasosas e um sistema para separação da biomassa formada. O tanque de cultura contém o micro-organismo e é normalmente projetado em material que permita passagem de luz oferecendo um pequeno caminho ótico até a fonte de iluminação. O sistema de iluminação consiste tipicamente de lâmpadas fluorescentes (iluminação artificial) ou coletores de energia solar (iluminação natural). O sistema de troca gasosa é responsável por introduzir a

fonte de carbono e retirar o oxigênio gerado pela fotossíntese e o sistema de separação consiste em um processo de concentração da biomassa para posterior processamento (GREENWELL *et al.*, 2009).

1.5 Recuperação da biomassa

A separação da biomassa é considerada uma das partes mais problemáticas e caras, na produção de biomassa de microalga, pela baixa concentração celular atingida nesse tipo de cultivo ($0,3$ a 5g.L^{-1}). Por outro lado, 300 a 400 g de massa seca por litro são valores ótimos de concentração celular para uma pasta de células (WANG *et al.*, 2008), gerando o principal desafio desse processo, que é elevar de 100 a 1000 vezes a concentração da solução. Os custos do processo podem ser os maiores componentes da produção, atingindo entre 20 e 30% do custo total (MOLINA GRIMA *et al.*, 2003; GREENWELL *et al.*, 2009).

Existem inúmeras técnicas que podem ser aplicadas, sendo a sedimentação gravitacional, flotação, floculação, centrifugação e filtração as mais conhecidas (GREENWELL *et al.*, 2009). Normalmente são utilizados um ou mais processos de separação para células de tamanho inferior a $3\text{ }\mu\text{m}$ (MOLINA GRIMA *et al.*, 2003). Quando a separação é realizada em dois estágios, o primeiro visa concentrar de 100 a 800 vezes gerando uma solução contendo de 2 a 7% de matéria sólida e o segundo estágio promove o aumento da concentração celular formando uma pasta. No primeiro estágio podem ser utilizadas as tecnologias de floculação, flotação e sedimentação gravitacional, já no segundo são utilizadas as tecnologias de centrifugação, filtração e ultra-som (BRENNAN e OWENDE, 2010). A escolha da técnica de separação depende principalmente das características do micro-organismo, isto é, tamanho, densidade e valor dos produtos a serem obtidos (OLAIZOLA, 2003). A **Tabela 2.5** apresenta a comparação de alguns dos processos de separação que podem ser utilizados em cultivos de microalgas.

Tabela 2.5: Comparação de alguns dos processos de separação de microalgas.

Métodos de separação	Concentração dos sólidos suspensos (%)	Custo de operação	Espécies de algas
Centrifugação	Elevada (<22%)	>90%	Quase todas as espécies exceto as muito frágeis
Filtração	Média à Elevada (5-18%)	20 – 90%	Algas com células grandes
Floculação	Baixa à Média (3-6%)	50 – 90%	Algas com baixa densidade celular
Biofloculação	Baixa à Média (2-5%)	~90%	-
Sedimentação	Baixa (0,5 à 3%)	10 – 90%	Algas com elevada densidade celular

Fonte: (SHEN *et al.*, 2009).

Sedimentação: A sedimentação por ação da gravidade é o processo mais comum para separação de biomassa em águas residuais devido aos grandes volumes tratados e o reduzido valor agregado da biomassa gerada. No entanto o método é adequado apenas para micro-organismos com mais de 70 µm de diâmetro (BRENNAN e OWENDE, 2010).

Floculação: Vários métodos de floculação podem ser usados para agregar as células das microalgas e aumentar o tamanho efetivo das células facilitando os processos de sedimentação, centrifugação e filtração. As células apresentam superfície com carga negativa para prevenir a agregação quando em suspensão. Nesse sentido, os processos de floculação consistem em neutralizar ou reduzir essa carga pela adição de agentes floculantes com cátions polivalentes ou polímeros catiônicos. Um agente floculante deve ser não tóxico, eficaz em baixas concentrações e barato. Além disso, ele deve ser escolhido de modo que as próximas etapas do processo não sejam afetadas por sua presença (MOLINA GRIMA *et al.*, 2003; HARUN *et al.*, 2010). Sais de metais multivalentes como FeCl_3 , $\text{Al}_2(\text{SO}_4)_3$ e $(\text{Fe}_2(\text{SO}_4)_3)$ são bons agentes floculantes (BRENNAN e OWENDE, 2010).

Um processo natural de floculação, a autofloculação, pode ser observado pela formação espontânea de flocos de micro-algas que sedimentam. Uma das causas desse processo é a precipitação de sais de carbonato em soluções de elevado pH, obtidos em consequência da atividade fotossintética tanto pelo consumo de dióxido de carbono como pela precipitação de compostos inorgânicos (UDUMAN *et al.*, 2010;

CHEN *et al.*, 2011). HARITH *et al.* (2009) evidenciaram a possibilidade de obtenção de diferentes resultados de eficiência de recuperação, para a auto-floculação por ajuste de pH, quando são utilizadas soluções de NaOH e de KOH.

Flotação: Os métodos de flotação se baseiam em passar bolhas de ar através da mistura de células, fazendo com que as células fiquem ligadas ao ar e se desloquem para a superfície onde irão se acumular na forma de espuma (BRENNAN e OWENDE, 2010).

Centrifugação: A maioria das microalgas pode ser separada por centrifugação, sendo este o método preferido para a separação de biomassa que contém metabólitos de elevado valor agregado, e para que a vida de prateleira dos produtos seja aumentada (MOLINA GRIMA *et al.*, 2003; HARUN *et al.*, 2010). A centrifugação envolve a aplicação da aceleração centrípeta para separar as microalgas em regiões de maior e menor densidade.

Uma vez separadas, as algas podem ser removidas a partir da cultura, por drenagem do meio em excesso. Filtros também podem ser utilizados durante a centrifugação para separar o sobrenadante do meio. Apesar de ser um método plausível para a separação de microalgas, as forças de cisalhamento durante o processo podem prejudicar as células, havendo a necessidade de se limitar a velocidade de centrifugação (HARUN *et al.*, 2010). Estudos demonstraram a possibilidade de recuperação de 80 a 90%, das microalgas contidas em lagoas de efluente, a partir da centrifugação por 2 a 5 minutos em 500 a 1000 g (MOLINA GRIMA *et al.*, 2003).

Filtração: Pode ser utilizada para separar células maiores de 70 µm como a da *Spirulina*, mas não pode ser empregada para espécies com dimensões inferiores a 30 µm, como a *Scenedesmus*, *Dunaliella* e *Chlorella*. Nestes casos, membranas de micro-filtração e ultra-filtração são mais eficientes (BRENNAN e OWENDE, 2010).

1.6 Geração de energia

A biomassa de microalga pode ser utilizada na geração de energia. Os principais processos envolvem conversões termoquímicas, conversões bioquímicas e reações químicas (**Figura 2.5**). A conversão bioquímica utiliza diferentes rotas metabólicas dos micro-organismos, a conversão termoquímica é a decomposição térmica dos compostos orgânicos presentes na biomassa, e ainda transformações da biomassa a partir de reações químicas. Nesses processos há a geração de combustíveis (AMIN, 2009; BRENNAN e OWENDE, 2010; DEMIRBAS, 2010).

Gaseificação: Envolve a oxidação parcial da biomassa em uma mistura de gases combustíveis, em altas temperaturas (800-1000 °C) (AMIN, 2009). Neste processo, a biomassa reage com oxigênio e água (vapor) gerando o gás de síntese, ou seja, uma mistura de CO, H₂, CO₂, N, e CH₄. O gás de síntese é um gás de poder calorífico baixo que pode ser queimado diretamente ou utilizado como combustível para motores ou turbinas a gás (BRENNAN e OWENDE, 2010).

Liquefação termoquímica: Processo que pode ser empregado para converter biomassa úmida em combustíveis líquidos (AMIN, 2009; HUANG *et al.*, 2010) ocorrendo em baixas temperaturas (300-350 °C) e elevadas pressões (50-20 MPa) (BRENNAN e OWENDE, 2010) auxiliado ou não pela presença de um catalisador (ROSS *et al.*, 2010).

Pirólise: Trata da conversão de biomassa em óleo, gás de síntese e carvão por meio de elevadas temperaturas (350-700 °C) e na ausência de ar (AMIN, 2009; ABBASI e ABBASI, 2010; HUANG *et al.*, 2010). Existem três principais tipos de pirólise: “flash” pirólise, “fast” pirólise e “slow” pirólise. A primeira é realizada em temperatura moderada (500 °C) e tempo de residência do vapor de aproximadamente 1 segundo, gerando 75% de líquido, 13% de gás e 2% de sólidos. A segunda também ocorre em temperatura moderada (500 °C), mas o tempo de residência do vapor é de 10 a 20 segundos, gerando 50% de líquido, 30% de gás e 20% de sólidos. A terceira ocorre a 400 °C e com um longo tempo de residência, gerando 30% de líquidos, 35% de gás e 35% de sólidos (BRENNAN e OWENDE, 2010).

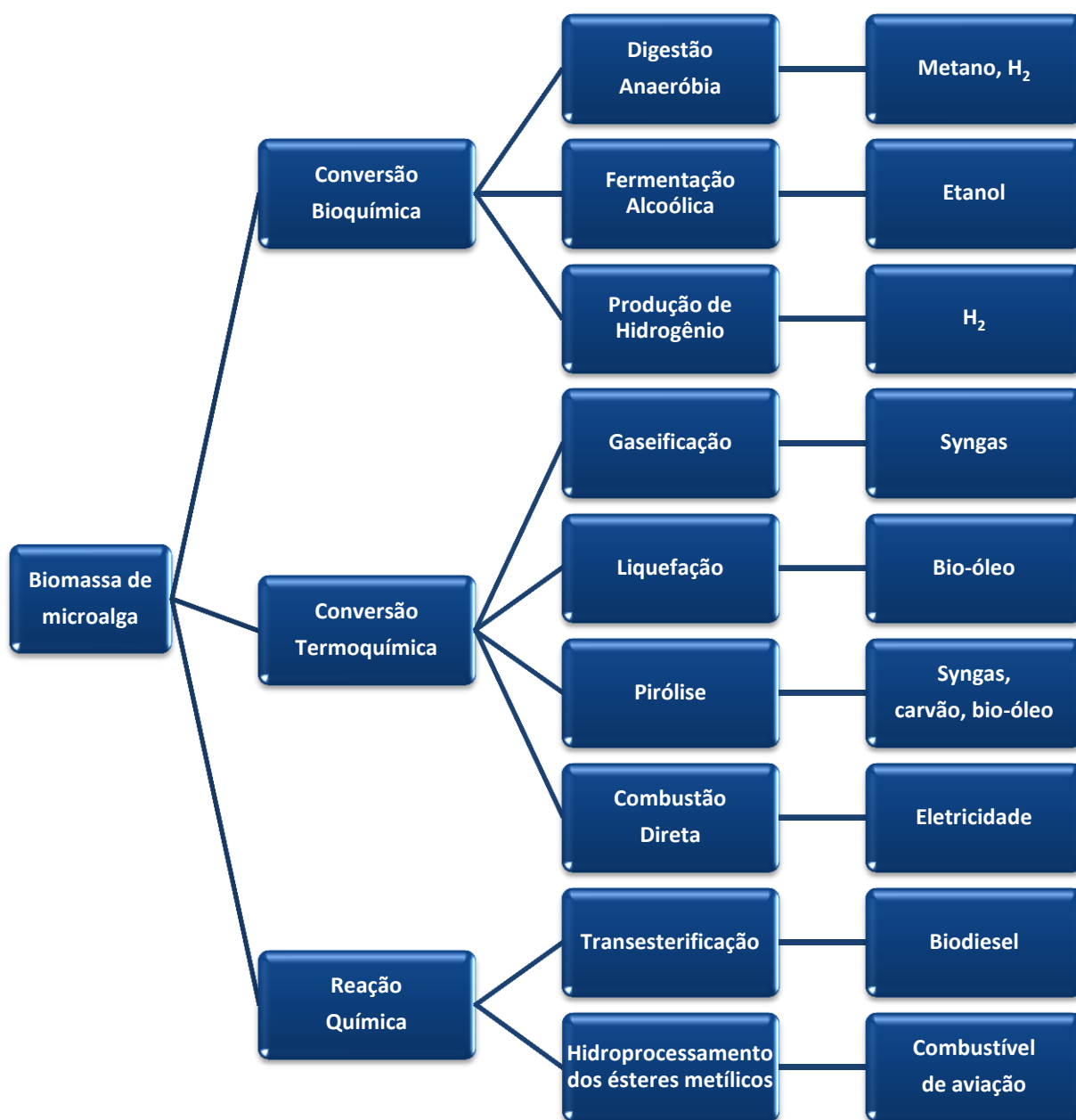


Figura 2.5: Principais técnicas para obtenção de energia a partir de biomassa de microalgas.

Fonte: (BRENNAN e OWENDE, 2010).

Combustão direta: Queima da biomassa na presença de ar para converter a energia química armazenada na biomassa em gases quentes, geralmente por meio de fornalhas, caldeiras ou turbinas a vapor, em temperaturas superiores a 800 °C. Esse processo apenas é viável para biomassa com teor de umidade inferior a 50% do peso

seco e o calor gerado deve ser utilizado imediatamente, pois o armazenamento não é viável (BRENNAN e OWENDE, 2010).

Digestão anaeróbia: Conversão de resíduos orgânicos em biogás (CH_4 , CO_2 e traços de outros gases) (ABBASI e ABBASI, 2010; RAS *et al.*, 2011), envolvendo a decomposição de matéria orgânica para produção de um gás com conteúdo energético cerca de 20-40% menor quando comparado com a matéria prima (BRENNAN e OWENDE, 2010). A resistência da célula é geralmente o principal fator limitante do processo (SIALVE *et al.*, 2009). O processo de digestão anaeróbia é adequado para resíduos de elevado teor de umidade (80-90%) e ocorre em três etapas: hidrólise, fermentação e metanogênese. Na hidrólise, os compostos são decompostos em açúcares solúveis, que serão convertidos, por meio de fermentação, em álcool, ácido acético, ácidos graxos voláteis e um gás contendo H_2 e CO_2 . Este gás será metabolizado principalmente em metano (60-70%) e dióxido de carbono (30-40%) (BRENNAN e OWENDE, 2010; ERSAHIN *et al.*, 2011).

Fermentação alcoólica: Transformação da biomassa que contém açúcares, amido ou celulose em etanol. A biomassa é moída e o amido é convertido em açúcares que depois serão misturados com água e fermento. O fermento decompõe o açúcar e o converte em etanol, sendo necessário um processo de purificação para remoção da água e outras impurezas diluídas no álcool. O álcool pode ser utilizado como complemento ou como substituto da gasolina e o resíduo sólido do processo fermentativo pode ser empregado na alimentação animal ou em processos de gaseificação. A *Chlorella vulgaris* é uma boa fonte de etanol devido ao seu elevado teor de amido (37% em peso seco) e por ser possível alcançar eficiências de até 65% de conversão (BRENNAN e OWENDE, 2010).

Hidrogênio: Sob condições anaeróbicas pode ser produzido a partir de microalgas, sendo que durante a fotossíntese, esses micro-organismos, convertem moléculas de água em íons de hidrogênio e oxigênio, sendo os íons de hidrogênios posteriormente convertidos em H_2 pelas enzimas hidrogenases (BRENNAN e OWENDE, 2010) (KAPDAN e KARGI, 2006). A atividade da enzima hidrogenase foi detectada em espécies *Scenedesmus obliquus*, *Chlorococcum littorale*, *Playtmonas*

subcordiformis e *Chlorella fusca*, mas não foi detectada em espécies *Chlorella vulgaris* e *Dunaliella salina* (KAPDAN e KARGI, 2006).

Reação de transesterificação: Reação também chamada de alcoólise, onde triglicerídeos são convertidos a ésteres (aproximadamente 90%) e glicerol (10%). Ocorre na presença de catalisadores que podem ser básicos (KOH, NaOH), ácidos (H_2SO_4 , HCl) e sólidos (Nb_2O_3 , Pt-Sn/ Al_2O_3). Catalisadores básicos podem gerar água que irá formar emulsão, reduzindo o rendimento do biodiesel e dificultar o processo de separação/recuperação do biodiesel. Catalisadores ácidos podem, simultaneamente, favorecer a esterificação e a transesterificação com elevados rendimentos, mas precisa de elevadas condições de temperatura, pressão e tempo. Catalisadores sólidos possuem elevada atividade e não geram a formação de água, mas as condições de operação não são brandas (MIAO *et al.*, 2009).

A **Figura 2.6** apresenta um esquema das rotas metabólicas relacionadas à produção de bio-hidrogênio, etanol e biodiesel.

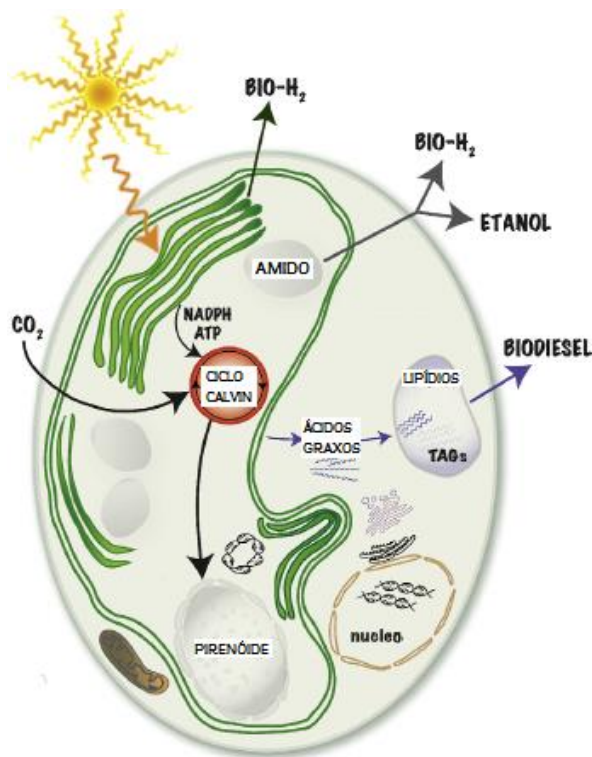


Figura 2.6: Rotas metabólicas de algas verdes para produção de biodiesel e bio-hidrogênio.

Fonte: (BEER *et al.*, 2009).

1.7 Sistemas de extração/purificação dos produtos intracelulares

Os processos de extração/purificação de bioprodutos são a chave para a obtenção de produtos de elevada qualidade. Devido à diversidade dos produtos que podem ser obtidos, não existe uma técnica de purificação de aplicação geral, sendo necessário escolher a melhor técnica em função das características do produto de interesse, bem como do valor comercial (SCHMIDELL *et al.*, 2001). As técnicas mais comumente utilizadas são extração líquido-líquido, ultra-filtração, extração com fluido super-crítico (QUEIROZ *et al.*, 2001) e pressão (HARUN *et al.*, 2010).

Em geral, quando o processo de extração é utilizado para óleos, busca-se alcançar os seguintes objetivos: i) obter a gordura ou óleo intacto e livre de impurezas indesejáveis; ii) obter o maior rendimento possível sem alterar o custo do processo; iii) produzir o mínimo de resíduos e que este apresente o maior valor agregado possível. A escolha do método ideal para extração, em larga escala de óleo de microalga, deve obedecer a certos parâmetros: facilidade com que a célula se rompe, custo do método, velocidade de ruptura celular e etc. (LASSING *et al.*, 2008).

Extração líquido-líquido: O processo de extração líquido-líquido tem se mostrado eficiente na extração de lipídios de microalgas. A extração do óleo da fase aquosa ocorre em função da sua elevada solubilidade em solventes orgânicos quando comparada a solventes aquosos. Os solventes mais utilizados são benzeno, ciclohexano, hexano, acetona e clorofórmio, sendo o hexano o mais citado por possuir elevada capacidade de extração e baixo custo (MOLINA GRIMA *et al.*, 2003; HARUN *et al.*, 2010). A desvantagem é que esses produtos, além de apresentarem certos riscos no processo de sua manipulação, também acarretam mais um processo, que é a separação entre solventes e o óleo por meio de destilação, exigindo energia extra (LASSING *et al.*, 2008).

Ultrafiltração: Consiste no transporte de soluções através de membranas com poros de diâmetros de 0,001 a 0,1 μm (ROSSIGNOL *et al.*, 1999), sob pressão transmembrana de 100 a 500 kPa e fluxo de filtrado de 10 a 200 L/hm² (SCHMIDELL *et al.*, 2001). É uma técnica de fracionamento baseada na diferença de tamanho das

macromoléculas, com potencial para aplicação em larga escala, tanto para a purificação, como para o polimento de produtos biológicos, tais como proteínas, polissacarídeos, enzimas, drogas terapêuticas e anticorpos. Contudo, a resolução da técnica é baixa e depende da membrana utilizada (distribuição e tamanho dos poros) (SCHMIDELL *et al.*, 2001).

Extração supercrítica: A extração com CO₂ supercrítico é uma tecnologia verde que possui potencial para assumir o lugar da extração com solventes orgânicos. As vantagens incluem baixa toxicidade do fluido supercrítico, equilíbrio favorável em relação à transferência de massa devido à difusão e propriedades de viscosidade do fluido. Existe a possibilidade de extração de 100% do óleo. A principal desvantagem do processo é o elevado custo associado à infra-estrutura e operação (HALIM *et al.*, 2011).

Cromatografia: Cromatografia por fluido supercrítico tem sido utilizada para recuperação da astaxantina, ácidos graxos poli-insaturados e outros compostos. Cromatografia de fase reversa e cromatografia por adsorção em sílica gel tem sido utilizadas para recuperação de ácidos graxos puros. Proteínas são geralmente recuperadas por cromatografia de troca iônica (MOLINA GRIMA *et al.*, 2003).

Para produtos que requerem grau de pureza muito elevado, tais como fármacos de uso humano, torna-se indispensável o emprego de processos cromatográficos de purificação, dada a alta seletividade e resolução dos mesmos. Dentre as técnicas cromatográficas, a adsorção por afinidade, que tem como base o reconhecimento específico entre a proteína de interesse e o ligante de afinidade, se destaca na purificação de proteínas que se encontram diluídas em um meio complexo, tais como os encontrados em processos biotecnológicos (ROPER e LIGHTFOOT, 1995).

1.8 Produtos de origem de microalga

O cultivo de microalgas teve início em 1960 com as espécies *Chlorella* e *Spirulina*, para produção de suplementos dietéticos, *Dunaliella salina* para obtenção de β-caroteno, *Haematococcus pluvialis* obtendo-se astaxantina (BERTOLDI *et al.*, 2008).

Atualmente existe um crescimento mundial na produção de biomassa devido às suas diversas aplicações, dentre elas a produção de proteína unicelular, carotenóides, clorofilas, enzimas, ésteres, vitaminas, lipídios (BECKER, 1994; PULZ e GROSS, 2004; RICHMOND, 2004), tratamento de águas residuais (MUÑOZ e GUIEYSSE, 2006), biofertilizante para o solo e bioindicadores de nutrientes e/ou substâncias tóxicas (DERNER *et al.*, 2006). Também pode ser produzida uma gama de moléculas bioativas com propriedades antibióticas, anticarcinogênica, antiinflamatórias, antivirais, redutoras do colesterol, enzimáticas e com outras atividades farmacológicas (DERNER *et al.*, 2006). A produção de biomassa de microalga ainda pode ser relacionada com a mitigação do efeito estufa, pela assimilação do CO₂ e pela produção de biodiesel e outros combustíveis, como CH₄, H₂ e etanol (JACO-BLOPES *et al.*, 2008; BRENNAN e OWENDE, 2010; MATA *et al.*, 2010; GHASEMI *et al.*, 2012; MAKAREVICIENE *et al.*, 2013; PERALTA-RUIZ *et al.*, 2013).

A **Tabela 2.8** relaciona os principais produtos de microalgas classificados em função do valor agregado. A

Tabela 2.7 e a **Tabela 2.7** apresentam os principais candidatos a produtores de biodiesel de microalga em fotobiorreatores e sistemas abertos. A **Figura 2.7** apresenta um esquema da produção de biomassa e suas possíveis aplicações.

Tabela 2.6: Produtos obtidos a partir de biomassa de microalgas classificados em função do valor agregado.

Valor	Produto
<u>Elevado</u>	Astaxantina, betacaroteno, ácidos graxos poli-insaturados, coenzimas, produtos anticelulite, anti-idade, para tratamento de peles sensíveis, antibactericida, antiviral, antifúngico
<u>Elevado-moderado</u>	Proteína, Agar, alginato, carragena, tintas, corantes (sorvete, geléia, doces, suco, batom, creme, loção corporal), clorofila, ficocianina, ficoeritrina, fucoxantina
<u>Moderado-baixo</u>	Aquicultura, alimentação animal, fertilizante, polímeros, plásticos, lubrificantes, tratamento de efluentes, tratamento de correntes gasosas, captura de CO ₂ /crédito de C, biodiesel, biogás, etanol, biohidrogênio

Fonte: http://www.oilgae.com/non_fuel_products/non_fuel_products_from_algae.html

Tabela 2.7: Pesquisa de biodiesel de microalga em sistemas fechados.

Empresa/ Região	Estratégias e comentários
A2BE Carbon Capture, Boulder Colorado, USA	Fundada em 2007, desenvolveu o CCR, sistema de reciclo e captura de carbono, criando um sistema renovável de produção de combustível. Esse sistema combina a tecnologia de captura de dióxido de carbono por microalgas com o processo de gaseificação de biomassa.
GreenFuel Technologies Cambridge, Massachusetts, USA	Empresa fundada em 2001. Utilizam CO ₂ reciclado para alimentar as algas. Desenvolveram um sistema capaz de capturar até 80% do CO ₂ emitido durante o dia (quando a luz solar está disponível) por uma usina de energia. Afirmam que utilizando sua tecnologia patenteada em uma área de 1 hectare é possível obter 7.000 litros de querosene de aviação, 5000 litros de etanol, de 1000 toneladas de proteína, 200 quilos de nutrientes especializados e 20 quilos de pigmentos. Encerrou atividades em 2009.
Solazyme, Inc. San Francisco, USA	Empresa de biotecnologia fundada em 2003 e que utiliza microalgas para a produção de óleo limpo, bicomcombustíveis de alta performance e produtos químicos. A produção é realizada com fonte de carbono orgânico e na ausência de luz. Afirmam que o processo é 1000 vezes mais eficiente que processos naturais.
Algenol Biofuels, Fort Meyers, Florida, USA	Fundada em 2006 para desenvolver sistemas de cultivo em larga escala e situados em áreas desérticas para produção de etanol a partir de algas, água do mar e CO ₂ . Patente sobre a utilização de cianobactérias fixadoras de N ₂ para redução dos custos com fertilizantes. Projeto para produção de etanol por cianobactérias que consigam secretá-lo para o meio de cultivo, diminuindo os gastos energéticos para recuperação do produto e mantendo a cultura estável.
Inventure Chemical tec., Seattle, USA	Iniciou as operações em 2007. Patente pendente sobre a produção de combustível para aviação. As algas utilizadas para a produção de bicomcombustível são originárias das instalações em Israel, Arizona, e na Austrália.
Solena, Washington State, USA	Empresa fundada em 2006 e possui tecnologia patenteada para gaseificar algas e outras substâncias orgânicas gerando saídas de alta energia. Projeto junto com a empresa Kanas para construir uma usina de 40 MW, que irá operar com os gases de síntese produzidos a partir da gaseificação das algas. O cultivo ocorrerá em reatores de plástico (<i>bag reactors</i>), utilizando luz solar e bicarbonato de sódio (subproduto de uma usina a carvão adjacente).
Solix Biofuels, Fort Collins, Colorado, USA	Empresa fundada em abril de 2006, utilizando microalgas para produção de bicomcombustíveis comercialmente viáveis que irão desempenhar papel fundamental na resolução de alterações climáticas e da escassez de petróleo, sem concorrer no fornecimento global de alimentos. Propostas para construir a sua primeira instalação em larga escala perto da Cervejaria New Belgian, onde o CO ₂ produzido durante a produção de cerveja seria usada como fonte de carbono para as algas

Fonte: adaptado (SINGH e GU, 2010).

Tabela 2.8: Principais produtores de biodiesel de microalga em reatores abertos.

Empresa/ Região	Estratégias e comentários
LiveFuels, Menlo Park Califórnia, USA	Fundada em 2006, ao invés de tentar converter as algas diretamente em biodiesel ou etanol, criaram o que é chamado de "green crude", que pode ser usado diretamente pelo sistema de refinaria atual. Criaram uma aliança nacional de cientistas liderada pelo NREL dos EUA que está centrada na produção de bio-óleo bruto até o ano de 2010.
OriginOil Inc., Los-Angeles, Califórnia, USA	Fundada em 2007, desenvolve uma tecnologia para transformar algas em verdadeiro concorrente ao petróleo. A empresa alega que sua tecnologia patenteada vai produzir "óleo novo" a partir de algas, por um processo de produção rentável e de alta velocidade. Esta fonte de "óleo novo" pode ser usada para muitos produtos, tais como diesel, gasolina, os combustíveis para aviação, plásticos e solventes, sem os efeitos do aquecimento global.
PetroSun, Scottsdale, Arizona, USA	Empresa fundada em 2008. Construíram uma fábrica para produção de biocombustível a partir de algas em Rio Honda, Texas, em abril de 2007. Trata-se de uma rede de 1.100 hectares de lagoas de água salgada com produção estimada em 4,4 milhões de litros de óleo de algas e 110 milhões de quilos de biomassa por ano. A empresa também pretende extrair óleo de algas no local e transportá-lo para suas refinarias de biodiesel. Projeto de construção de novas unidades no Alabama, Arizona, Louisiana, México, Brasil e Austrália. Também criou uma equipe em conjunto com a Science Applications International para criação de biodiesel de aviação.
Neste Oil, Helsinki, Europa	Fundada em 1948, refina óleos vegetais e de algas produzindo 170 mil toneladas de biodiesel por ano, que pode ser utilizado em todos os motores a diesel. Principal objetivo: possuir 70% de suas matérias-primas provenientes de matérias-primas não alimentares em 10 anos e 100% em 2020.
Ingrepo, Netherlands, Europa	Grande empresa de biotecnologia especializada na produção de algas em escala industrial. Projetos de construção e instalação de unidades de produção na Malásia, com colaboração da BioMac Sdn Bhd. A escolha da Malásia se deve às suas boas condições climáticas, infra-estrutura e interesse do governo na área de biotecnologia e agro-alimentar.
Sapphire Energy, San Diego, USA	Fundada em 2007, iniciou uma nova categoria de produção de biocombustíveis, chamada de "petróleo verde". A empresa construiu uma plataforma que converte a luz solar e CO ₂ em alternativas renováveis. Os produtos são quimicamente idênticos às moléculas do petróleo cru, tornando os produtos inteiramente compatíveis com a infra-estrutura energética atual - veículos, refinarias e gasodutos.
Seambiotic, Ashkelon Israel, Mediterraneo	Fundada em 2003, produz algas para diversas aplicações, incluindo alimentos, química fina e biocombustíveis. Unidade opera utilizando o CO ₂ gerado pela Israel Electric Company (IEC).

Fonte: adaptado de (SINGH e GU, 2010).

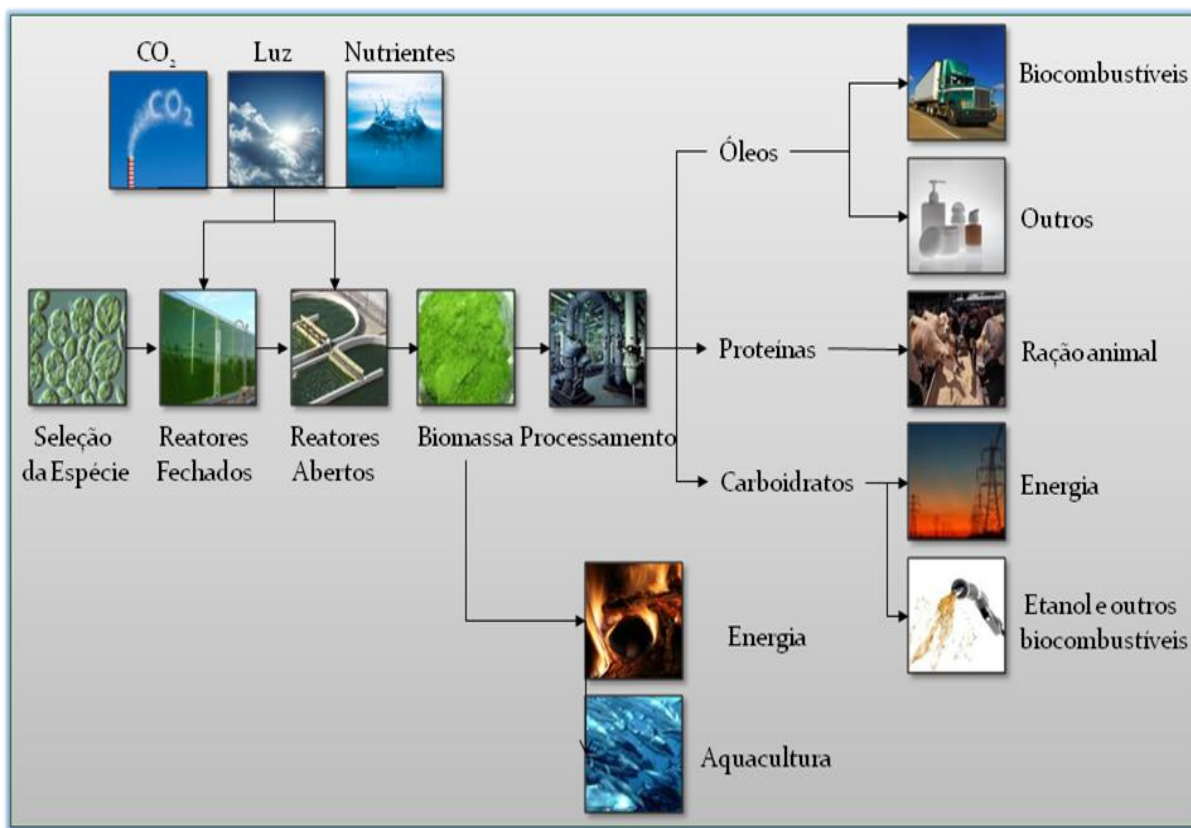


Figura 2.7: Processo de produção de biomassa.

Fonte: adaptado de www.hrbp.com.

1.9 Comercialização da *Chlorella* sp.

Espécies de *Chlorella* são encontradas em todos os habitats aquáticos (água doce e água salgada) e possuem ciclos de vida e requisitos nutricionais simples. Sua classificação é complexa porque as espécies não podem ser diferenciadas por características morfológicas, sendo utilizados critérios fisiológicos e bioquímicos para isso. Na reprodução, que é exclusivamente assexuada, cada célula madura se divide produzindo normalmente quatro ou oito (e, mais raramente, 16) auto-esporos, que são liberados pela ruptura ou dissolução das paredes parentais (RICHMOND, 2004).

A *Chlorella* é uma das espécies mais estudadas e comercializadas atualmente, sendo mais de 70 empresas (SPOLAORE *et al.*, 2006) responsáveis pela produção de cerca de 2000 toneladas de biomassa seca por ano (PULZ e GROSS, 2004) com um

custo de produção de aproximadamente US\$ 17,00 por kilograma de biomassa (RAJA *et al.*, 2008) e valor de venda de aproximadamente US\$ 44,50 por kilograma de biomassa seca ou US\$ 61,80 por litro (BRENNAN e OWENDE, 2010).

A primeira planta piloto para cultivo da *Chlorella* foi desenvolvida e testada em Boston (EUA) em 1953, seguida por Israel, Japão, Alemanha e Checoslováquia (RICHMOND, 2004) e atualmente, os principais cultivos da *Chlorella* estão situados no Japão, Taiwan, USA, Tailândia, China, Índia, Vietnam, Chile, Bulgária, Indonésia e República Checa, sendo eles tanques circulares de $1,5 \cdot 10^4$ L, raceways de $3 \cdot 10^4$ L, sistemas em cascata com chicanas de $3 \cdot 10^4$ L e fermentadores maiores de $1 \cdot 10^3$ L (BOROWITZKA, 1999). A Taiwan *Chlorella* Manufacturing and Co. (Taipei, Taiwan) é a maior produtora com mais de 400 toneladas de biomassa seca produzida por ano. Cerca de 150 toneladas de biomassa seca são produzidas em Klötze, na Alemanha, em um fotobiorreator tubular. O reator consiste em um compacto e vertical arranjo de tubos horizontais com comprimento total de 500 quilômetros e 600 m^3 (**Figura 2.8**). As vendas anuais de *Chlorella* excedem US\$ 38 bilhões de dólares (SPOLAORE *et al.*, 2006). A **Tabela 2.9** apresenta os principais dados da literatura sobre a espécie *C. vulgaris*.

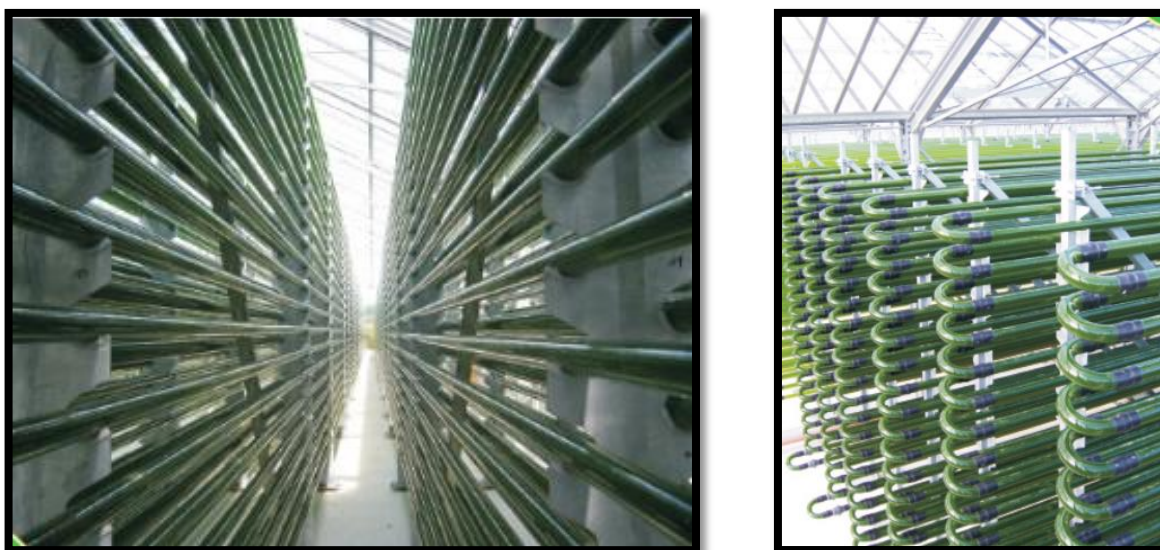


Figura 2.8: Fotobiorreator de 600 m^3 produzindo *Chlorella* em Klötze, Alemanha.

Fonte: <http://www.algomed.de/media/publikationen/algomed01.pdf>.

Tabela 2.9: Principais dados sobre a *Chlorella vulgaris*.

Parâmetro	Descrição		
Filo	<i>Chlorophyta</i>		
Geometria	Esférica medindo entre 5 e 20 µm de diâmetro		
Pigmentos	Clorofilas 'a' e 'b' e carotenóides		
Fórmula Empírica	C ₆ H ₁₁ O ₃ N		
Análise Elementar	C: 45-50%	O: 32-37%	H: 6,8-9%
	N: 2-11%		
Composição (100g massa seca)	Umidade 3,87%	Proteínas 47,82%	Cinzas 6,30%
	Lipídios 13,32%	Carboidratos 8,08%	Energia 1430kJ
Nutrientes (mg/100g massa seca)	1346,4 Na	1761,5 P	593,7 Ca
	259,1 Fe	344,3 Mg	49,92 K
	2,09 Mn	1,19 Zn	0,07 Se
	0,02 Cr		
Principais Ácidos	C18:1 <i>n</i> -9	C22:6 <i>n</i> -3	C16:0
Graxos	18:2 <i>n</i> -6	C18:0	
µ _{máx} (h ⁻¹) autotrófico	0,081 e 0,110 em aplicações comerciais.		
µ _{máx} (h ⁻¹) heterotrófico	0,050 e 0,098 em aplicações comerciais		
µ _{máx} (h ⁻¹) mixotrófico	0,131 e 0,198 em aplicações comerciais		

Fontes: (MILNER, 1953; OGAWA e AIBA, 1981; MARTÍNEZ e ORÚS, 1991; ADAMS, 1997; TOKUŞOGLU e ÜNAL, 2003).

Estudos experimentais realizados com espécies de *Chlorella* demonstraram que ela proporciona aumentos na degradação hepática do colesterol pela super-regulação da expressão do colesterol 7α-hydroxylase em ratos e que os carotenóides (*xanthophylls*, *violaxanthin* e *zeaxanthin*) presentes na *Chlorella*, são capazes de inibir o crescimento das células de câncer de cólon humano. Ela também contém elementos antioxidantes como α-caroteno, β-caroteno, ácido ascórbico, tocoferol e aproximadamente 2-4mg/g de massa seca de luteína que é um forte antioxidante e pode ser utilizado na redução da incidência de câncer. (PLAZA *et al.*, 2010).

2. Referências

ABALDE, J. **Microalgas: cultivo e aplicaciones**. España, Universidade da Coruña, 1999. 210

ABBASI, T.; ABBASI, S. A. Biomass energy and the environmental impacts associated with its production and utilization. **Renewable and Sustainable Energy Reviews**, v. 14, n. 3, p. 919-937, 2010.

ADAMS, M. **Superfoods for optimal health: *Chlorella* and *Spirulina***. London: Taylor & Francis 1997.

AMIN, S. Review on biofuel oil and gas production processes from microalgae. **Energy Conversion and Management**, v. 50, n. 7, p. 1834-1840, 2009.

ANJOS, M.; FERNANDES, B. D.; VICENTE, A. A.; TEIXEIRA, J. A.; DRAGONE, G. Optimization of CO₂ bio-mitigation by *Chlorella vulgaris*. **Bioresource Technology**, v. 139, n. 0, p. 149-154, 2013.

AVALOS, J.; MAIBACH, H. I. **Beneficial uses of plants**. Boca Raton: CRC Press LLC, 2000.

BARSANTI, L.; GUALTIERI, P. **Algae – Anatomy, Biochemistry And Biotechnology**. Taylor & Francis Group, 2006.

BECKER, E. W. **Microalgae biotechnology and microbiology**. Cambridge: Cambridge University Press, 1994.

BEER, L. L.; BOYD, E. S.; PETERS, J. W.; POSEWITZ, M. C. Engineering algae for biohydrogen and biofuel production. **Current Opinion in Biotechnology**, v. 20, n. 3, p. 264-271, 2009.

BERTOLDI, F. C.; SANT'ANNA, E.; OLIVEIRA, J. L. B. Revisão: Biotecnologia de microalgas. **B. CEPPA**, v. 26, p. 9-20, 2008.

BOROWITZKA, M. A. Commercial production of microalgae: ponds, tanks, tubes and fermenters. **Journal of Biotechnology**, v. 70, n. 1-3, p. 313-321, 1999.

BORZANI, W.; SCHMIDELL, W. S.; LIMA, U. A.; AQUARONE, E. **Biotechnologia industrial: fundamentos**. Edgard Blucher, 2001.

BRENNAN, L.; OWENDE, P. Biofuels from microalgae--A review of technologies for production, processing, and extractions of biofuels and co-products. **Renewable and Sustainable Energy Reviews**, v. 14, n. 2, p. 557-577, 2010.

CHEN, C.-Y.; YEH, K.-L.; AISYAH, R.; LEE, D.-J.; CHANG, J.-S. Cultivation, photobioreactor design and harvesting of microalgae for biodiesel production: A critical review. **Bioresource Technology**, v. 102, n. 1, p. 71-81, 2011.

CHENG, L.; ZHANG, L.; CHEN, H.; GAO, C. Carbon dioxide removal from air by microalgae cultured in a membrane-photobioreactor. **Separation and Purification Technology**, v. 50, n. 3, p. 324-329, 2006.

CHISTI, Y.; MOO-YOUNG, M. **Bioreactors**. In: EDITOR-IN-CHIEF: ROBERT, A. M. (Ed.). Encyclopedia of Physical Science and Technology (Third Edition). New York: Academic Press, 2003. p.247-271.

CINAR, A. C. **Batch Fermentation: Modeling, Monitoring, and Control**. Marcel Dekker, 2003.

DEMIRBAS, A. Use of algae as biofuel sources. **Energy Conversion and Management**, v. 51, n. 12, p. 2738-2749, 2010.

DERNER, R. B.; OHSE, S.; VILELLA, M.; CARVALHO, S. M.; FETT, R. Microalgas, produtos e aplicações. **Ciência Rural**, v. 36, n. 6, p. 1959-1967, 2006.

ENERGY, U. S. D. O. NREL - National Renewable Energy Laboratory. www.nrel.gov, 2012. Acesso em: 01/09/2010.

ERSAHIN, M. E.; GOMEZ, C. Y.; DERELI, R. K.; ARIKAN, O.; OZTURK, I. Biomethane production as an alternative bioenergy source from codigesters treating municipal sludge and organic fraction of municipal solid wastes. **J Biomed Biotechnol**, v. 2011, p. 953065, 2011.

GHASEMI, Y.; RASOUL-AMINI, S.; NASERI, A. T.; MONTAZERI-NAJAFABADY, N.; MOBASHER, M. A.; DABBAGH, F. Microalgae biofuel potentials (Review). **Applied Biochemistry and Microbiology**, v. 48, n. 2, p. 126-144, 2012.

GREENWELL, H. C.; LAURENS, L. M. L.; SHIELDS, R. J.; LOVITT, R. W.; FLYNN, K. J. Placing microalgae on the biofuels priority list: a review of the technological challenges. **Journal of The Royal Society Interface**, 2009.

GROBBELAAR, J. Factors governing algal growth in photobioreactors: the “open” versus “closed” debate. **Journal of Applied Phycology**, v. 21, n. 5, p. 489-492, 2009.

HALIM, R.; GLADMAN, B.; DANQUAH, M. K.; WEBLEY, P. A. Oil extraction from microalgae for biodiesel production. **Bioresource Technology**, v. 102, n. 1, p. 178-185, 2011.

HARITH, Z. T.; YUSOFF, F. M.; MOHAMED, M. S.; SHARIFF, M.; DIN, M.; ARIFF, A. B. Effect of different flocculants on the flocculation performance of flocculation performance of microalgae, *Chaetoceros calcitrans*, cells. **African Journal of Biotechnology**, v. 8, n. 21, p. 5971-5978, 2009.

HARUN, R.; SINGH, M.; FORDE, G. M.; DANQUAH, M. K. Bioprocess engineering of microalgae to produce a variety of consumer products. **Renewable and Sustainable Energy Reviews**, v. 14, n. 3, p. 1037-1047, 2010.

HIRATA, S.; HAYASHITANI, M.; TAYA, M.; TONE, S. Carbon dioxide fixation in batch culture of *Chlorella* sp. using a photobioreactor with a sunlight-collection device. **Journal of Fermentation and Bioengineering**, v. 81, n. 5, p. 470-472, 1996.

HO, S.-H.; HUANG, S.-W.; CHEN, C.-Y.; HASUNUMA, T.; KONDO, A.; CHANG, J.-S. Bioethanol production using carbohydrate-rich microalgae biomass as feedstock. **Bioresource Technology**, v. 135, n. 0, p. 191-198, 2013.

HUANG, G.; CHEN, F.; WEI, D.; ZHANG, X.; CHEN, G. Biodiesel production by microalgal biotechnology. **Applied Energy**, v. 87, n. 1, p. 38-46, 2010.

JACO-BLOPES, E.; SCOPARO, C.; FRANCO, T. Rates of CO₂ removal by *Aphanothece microscopica Nāgeli* in tubular photobioreactors. **Chemical Engineering and Processing: Process Intensification**, v. 47, n. 8, p. 1365-1373, 2008.

JACOB-LOPES, E. **Sequestro de dióxido de carbono em fotobiorreatores**. Campinas: Departamento de Processos Químicos, UNICAMP, 2007. (DOUTORADO).

JACOB-LOPES, E.; LACERDA, L. M. C. F.; FRANCO, T. T. Biomass production and carbon dioxide fixation by *Aphanothece microscopica Nāgeli* in a bubble column photobioreactor. **Biochemical Engineering Journal**, v. 40, n. 1, p. 27-34, 2008.

KAJIWARA, S.; YAMADA, H.; OHKUNI, N.; OHTAGUCHI, K. Design of the bioreactor for carbon dioxide fixation by *Synechococcus* PCC7942. **Energy Conversion and Management**, v. 38, Supplement, n. 0, p. S529-S532, 1997.

KANTARCI, N.; YAMADA, H.; NARUMASA, O. Bubble column reactors. **Process Biochemistry**, v. 40, p. 2263-2283, 2005.

KAPDAN, I. K.; KARGI, F. Bio-hydrogen production from waste materials. **Enzyme and Microbial Technology**, v. 38, n. 5, p. 569-582, 2006.

KUMAR, A.; ERGAS, S.; YUAN, X.; SAHU, A.; ZHANG, Q.; DEWULF, J.; MALCATA, F. X.; VAN LANGENHOVE, H. Enhanced CO₂ fixation and biofuel production via microalgae: recent developments and future directions. **Trends in Biotechnology**, v. 28, n. 7, p. 371-380, 2010.

KUMAR, A.; ERGAS, S.; YUAN, X.; SAHU, A.; ZHANG, Q.; DEWULF, J.; MALCATA, F. X.; VAN LANGENHOVE, H. Enhanced CO₂ fixation and biofuel production via microalgae: recent developments and future directions. **Trends in Biotechnology**, v. 28, n. 7, p. 371-80, 2010.

KUMAR, K.; DASGUPTA, C. N.; NAYAK, B.; LINDBLAD, P.; DAS, D. Development of suitable photobioreactors for CO₂ sequestration addressing global warming using green algae and cyanobacteria. **Bioresource Technology**, v. 102, n. 8, p. 4945-4953, 2011.

LAKANIEMI, A.-M.; TUOVINEN, O. H.; PUHAKKA, J. A. Anaerobic conversion of microalgal biomass to sustainable energy carriers – A review. **Bioresource Technology**, v. 135, n. 0, p. 222-231, 2013.

LASSING, M.; MARTENSSON, P.; OLSSON, E.; SVENSSON, M. **Final report on biodiesel production from microalgae - a feasibility study**. Statoilhydro ASA. Oslo, Norway. 2008

LEE, R. E. **Phycology**. 4. Cambridge: Cambridge University Press, 2008.

LEITE, G. B.; ABDELAZIZ, A. E. M.; HALLENBECK, P. C. Algal biofuels: Challenges and opportunities. **Bioresource Technology**, n. 0, 2013.

MAKAREVICIENE, V.; SKORUPSKAITE, V.; ANDRULEVICIUTE, V. Biodiesel fuel from microalgae-promising alternative fuel for the future: a review. **Reviews in Environmental Science and Bio/Technology**, p. 1-12, 2013.

MARTÍNEZ, F.; ORÚS, M. I. Interactions between Glucose and Inorganic Carbon Metabolism in *Chlorella vulgaris* Strain UAM 101. **Plant Physiol**, v. 95, n. 4, p. 1150-1155, 1991.

MATA, T. M.; MARTINS, A. A.; CAETANO, N. S. Microalgae for biodiesel production and other applications: A review. **Renewable and Sustainable Energy Reviews**, v. 14, n. 1, p. 217-232, 2010.

MIAO, X.; LI, R.; YAO, H. Effective acid-catalyzed transesterification for biodiesel production. **Energy Conversion and Management**, v. 50, n. 10, p. 2680-2684, 2009.

MILNER, H. W. **The chemical composition of algae**. In: BURLEW, J. H. (Ed.). *Algae culture from laboratory to pilot plant*. Washington: Carnegil Institute, 1953. p.285-320.

MIRÓN, A. S.; GÓMEZ, A. C.; CAMACHO, F. G.; GRIMA, E. M.; CHISTI, Y. **Comparative evaluation of compact photobioreactors for large-scale monoculture of microalgae**. In: R. OSINGA, J. T. J. G. B. e WIJFFELS, R. H. (Ed.). *Progress in Industrial Microbiology*: Elsevier, v. Volume 35, 1999. p.249-270.

MOLINA, E.; FERNÁNDEZ, J.; ACIÉN, F. G.; CHISTI, Y. Tubular photobioreactor design for algal cultures. **Journal of Biotechnology**, v. 92, n. 2, p. 113-131, 2001.

MOLINA GRIMA, E.; BELARBI, E. H.; ACIÉN FERNÁNDEZ, F. G.; ROBLES MEDINA, A.; CHISTI, Y. Recovery of microalgal biomass and metabolites: process options and economics. **Biotechnology Advances**, v. 20, n. 7-8, p. 491-515, 2003.

MOLINA GRIMA, E.; FERNÁNDEZ, F. G. A.; GARCÍA CAMACHO, F.; CHISTI, Y. Photobioreactors: light regime, mass transfer, and scaleup. **Journal of Biotechnology**, v. 70, n. 1–3, p. 231-247, 1999.

MORAIS, M.; COSTA, J. Carbon dioxide fixation by *Chlorella kessleri*, *C. vulgaris*, *Scenedesmus obliquus* and *Spirulina* sp. cultivated in flasks and vertical tubular photobioreactors. **Biotechnology Letters**, v. 29, n. 9, p. 1349-1352, 2007.

MUÑOZ, R.; GUIEYSSE, B. Algal–bacterial processes for the treatment of hazardous contaminants: A review. **Water Research**, v. 40, n. 15, p. 2799-2815, 2006.

MURAKAMI, M.; IKENOUCHI, M. The biological CO₂ fixation and utilization project by rite (2) — Screening and breeding of microalgae with high capability in fixing CO₂ —. **Energy Conversion and Management**, v. 38, Supplement, n. 0, p. S493-S497, 1997.

OGAWA, T.; AIBA, S. Bioenergetic analysis of mixotrophic growth in *Chlorella vulgaris* and *Scenedesmus acutus*. **Biotechnol Bioeng**, v. 23, n. 5, p. 1121-1132, 1981.

OLAIZOLA, M. Commercial development of microalgal biotechnology: from the test tube to the marketplace. **Biomolecular Engineering**, v. 20, n. 4-6, p. 459-466, 2003.

ONO, E.; CUELLO, J. L. Carbon Dioxide Mitigation using Thermophilic Cyanobacteria. **Biosystems Engineering**, v. 96, n. 1, p. 129-134, 2007.

PERALTA-RUIZ, Y.; GONZÁLEZ-DELGADO, A. D.; KAFAROV, V. Evaluation of alternatives for microalgae oil extraction based on exergy analysis. **Applied Energy**, v. 101, n. 0, p. 226-236, 2013.

PLAZA, M.; SANTOYO, S.; JAIME, L.; GARCÍA-BLAIRSY REINA, G.; HERRERO, M.; SEÑORÁNS, F. J.; IBÁÑEZ, E. Screening for bioactive compounds from algae. **Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis**, v. 51, n. 2, p. 450-455, 2010.

PULZ, O.; GROSS, W. Valuable products from biotechnology of microalgae. **Appl Microbiol Biotechnol**, v. 65, n. 6, p. 635-48, 2004.

QUEIROZ, S. C. N.; COLLINS, C. H.; JARDIM, I. C. S. F. Métodos de extração e/ou concentração de compostos encontrados em fluidos biológicos para posterior determinação cromatográfica. . **Quím. Nova**, v. 24, n. 1, p. 68-76, 2001.

RADMER, R. J. Algal diversity and commercial algal products. **American Institute of Biological Sciences**, v. 46, p. 263-270, 1996.

RAJA, R.; HEMAISWARYA, S.; KUMAR, N. A.; SRIDHAR, S.; RENGASAMY, R. A Perspective on the biotechnological potential of microalgae. **Critical Reviews in Microbiology**, v. 34, n. 2, p. 77-88, 2008.

RAO, T. B. M. L. R.; SONOLIKAR, R. L.; SAHEB, S. P. Influence of magnetic field on the performance of bubble columns and airlift bioreactor with submersed microorganisms. **Chemical Engineering Science**, v. 52, n. 21–22, p. 4155-4160, 1997.

RAS, M.; LARDON, L.; BRUNO, S.; BERNET, N.; STEYER, J.-P. Experimental study on a coupled process of production and anaerobic digestion of *Chlorella vulgaris*. **Bioresource Technology**, v. 102, n. 1, p. 200-206, 2011.

RAVEN, P. H.; EVERT, R. F.; EICHHORN, S. E. **Biologia Vegetal**. 6. Rio de Janeiro: 2001.

REE, R. V.; ANNEVELINK, B. **Status Report Biorefinery**. Agrotechnology of Food Sciences Group. 2007

RICHMOND, A. **Handbook of microalgal culture : biotechnology and applied phycolgy**. Blackwell Science Ltd, 2004.

ROBARTS, R. D.; ZOHARY, T. Temperature effects on photosynthetic capacity, respiration and growth rates for bloom-forming cyanobacteria. **New Zealand Journal of marine and freshwater research**, v. 21, p. 391-399, 1987.

RODOLFI, L.; CHINI ZITTELLI, G.; BASSI, N.; PADOVANI, G.; BIONDI, N.; BONINI, G.; TREDICI, M. R. Microalgae for oil: strain selection, induction of lipid synthesis and outdoor mass cultivation in a low-cost photobioreactor. **Biotechnol Bioeng**, v. 102, n. 1, p. 100-112, 2009.

ROPER, D. K.; LIGHTFOOT, E. N. Separation of biomolecules using adsorptive membranes. **Journal of Chromatography A**, v. 702, n. 1–2, p. 3-26, 1995.

ROSS, A. B.; BILLER, P.; KUBACKI, M. L.; LI, H.; LEA-LANGTON, A.; JONES, J. M. Hydrothermal processing of microalgae using alkali and organic acids. **Fuel**, v. 89, n. 9, p. 2234-2243, 2010.

ROSSIGNOL, N.; VANDANJON, L.; JAOUEN, P.; QUÉMÉNEUR, F. Membrane technology for the continuous separation microalgae/culture medium: compared performances of cross-flow microfiltration and ultrafiltration. **Aquacultural Engineering**, v. 20, n. 3, p. 191-208, 1999.

SCHIMIDELL, W.; LIMA, U. A.; AQUARONE, E.; BORZANI, W. **Biotechnologia Industrial**. Edgar Blüncher, 2005.

SCHMIDELL, W. S.; LIMA, U. A.; AQUARONE, E.; BORZANI, W. **Biotechnologia industrial: engenharia bioquímica**. Edgard Blücher, 2001.

SHEN, Y.; YUAN, W.; PEI, Z. J.; WU, Q.; MAO, E. Microalgae mass production methods. **American society of agricultural and biological engineers**, v. 52, p. 1275-1287, 2009.

SIALVE, B.; BERNET, N.; BERNARD, O. Anaerobic digestion of microalgae as a necessary step to make microalgal biodiesel sustainable. **Biotechnology Advances**, v. 27, n. 4, p. 409-416, 2009.

SIEGEL, M. H.; BRENNER, A.; MERCHUK, J. C.; FRIEDMAN, M. Gas hold-up, mass transfer, and treatment efficiency of an upflow sludge blanket sequencing batch air-lift reactor for the treatment of high strength. **Trans. I. Cheme**, v. 72, p. 35-41, 1994.

SIERRA, E.; ACIÉN, F. G.; FERNÁNDEZ, J. M.; GARCÍA, J. L.; GONZÁLEZ, C.; MOLINA, E. Characterization of a flat plate photobioreactor for the production of microalgae. **Chemical Engineering Journal**, v. 138, n. 1-3, p. 136-147, 2008.

SIGEE, D. C. **Freshwater microbiology: Biodiversity and dynamic interactions of microorganisms in the aquatic environment**. England: John Wiley & Sons, LTD, 2005.

SINGH, J.; GU, S. Commercialization potential of microalgae for biofuels production. **Renewable and Sustainable Energy Reviews**, v. 14, n. 9, p. 2596-2610, 2010.

SPOLAORE, P.; JOANNIS-CASSAN, C.; DURAN, E.; ISAMBERT, A. Commercial applications of microalgae. **Journal of Bioscience and Bioengineering**, v. 101, n. 2, p. 87-96, 2006.

STEWART, C.; HESSAMI, M.-A. A study of methods of carbon dioxide capture and sequestration—the sustainability of a photosynthetic bioreactor approach. **Energy Conversion and Management**, v. 46, n. 3, p. 403-420, 2005.

SUBHADRA, B. G. Sustainability of algal biofuel production using integrated renewable energy park (IREP) and algal biorefinery approach. **Energy Policy**, v. 38, n. 10, p. 5892-5901, 2010.

TOKUŞOĞLU, Ö.; ÜNAL, M. K. Biomass nutrient profiles of three microalgae: *Spirulina platensis*, *Chlorella vulgaris*, and *Isochrysis galbana*. **Journal of Food Science**, v. 68, n. 4, p. 1144-1148, 2003.

TRAVIESO, L.; HALL, D. O.; RAO, K. K.; BENÍTEZ, F.; SÁNCHEZ, E.; BORJA, R. A helical tubular photobioreactor producing *Spirulina* in a semicontinuous mode. **International Biodeterioration & Biodegradation**, v. 47, n. 3, p. 151-155, 2001.

UDUMAN, N.; QI, Y.; DANQUAH, M. K.; HOADLEY, A. F. A. Marine microalgae flocculation and focused beam reflectance measurement. **Chemical Engineering Journal**, v. 162, n. 3, p. 935-940, 2010.

WANG, B.; LI, Y.; WU, N.; LAN, C. CO₂ bio-mitigation using microalgae. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v. 79, n. 5, p. 707-718, 2008.

WANG, S.-J.; ZHONG, J.-J. **Chapter 6 - Bioreactor Engineering**. In: SHANG-TIAN, Y. (Ed.). *Bioprocessing for Value-Added Products from Renewable Resources*. Amsterdam: Elsevier, 2007. p.131-161.

WMO. **The state of greenhouse gases in the atmosphere based on global observations through 2011**. World Meteorological Organization, p.1-4. 2012

YANG, H.; XU, Z.; FAN, M.; GUPTA, R.; SLIMANE, R.; BLAND, A.; WRIGHT, I. Progress in carbon dioxide separation and capture: A review. **Journal of Environmental Sciences**, v. 20, n. 1, p. 14-27, 2008.

YUN, Y. S.; LEE, S. B.; PARK, J. M.; LEE, C.; YANG, J. W. Carbon Dioxide Fixation by Algal Cultivation Using Wastewater Nutrients. **J. Chem. Tech. Biotechnol.**, v. 69, p. 451-455, 1997.

CAPÍTULO 3

MATERIAL E MÉTODOS

1. Material & Métodos

1.1. Micro-organismo e meio de cultivo

A *Chlorella vulgaris* (CPCC90), obtida do *Canadian Phycological Culture Centre*, foi utilizada em todos os experimentos. A cultura estoque foi mantida em Agar inclinado e propagada em meio líquido aerado por borbulhamento constante, nas condições de 25 °C e 15 $\mu\text{mol.m}^{-2}.\text{s}^{-1}$ de luminosidade, fotoperíodo de 24 h. O meio de cultivo utilizado foi o BBM - *Bold's Basal Medium* (STEIN, 1973), descrito na **Tabela 3.1**.

Tabela 3.1: Composição do meio sintético BBM (pH 6,8).

Componente	(g.L ⁻¹)	Componente	(g.L ⁻¹)
Na ₂ EDTA	0,050	Fe ₂ SO ₄ .7H ₂ O	0,00498
KOH	0,0031	H ₂ SO ₄ (μL/L)	1
CaCl ₂ .2H ₂ O	0,025	H ₃ BO ₃	0,01142
MgSO ₄ .7H ₂ O	0,075	ZnSO ₄ .7H ₂ O	0,00882
K ₂ HPO ₄	0,075	MnCl ₂ .4H ₂ O	0,00144
KH ₂ PO ₄	0,175	CuSO ₄ .5H ₂ O	0,00157
NaCl	0,025	Co(NO ₃) ₂ .6H ₂ O	0,00049
NaNO ₃	0,250	MoO ₃	0,00071

A manutenção da axênia das culturas estoque foi obtida a partir da utilização de álcool etílico 70% para assepsia das mãos e limpeza diária das bancadas, esterilização das vidrarias por agentes químicos e calor úmido (121°C por 20 minutos), flambagem das alças de inoculação para esterilização por calor seco e limpeza da câmara de fluxo laminar com álcool etílico 70% e radiação não ionizante por 30 minutos.

1.2. Preparo do inóculo

A microalga foi recebida em meio de cultivo sólido. A viabilidade e o crescimento do micro-organismo foram verificados a partir de repiques da amostra, sendo preparados 15 tubos de ensaio contendo solução de Agar-agar aquecido a 60 °C e

tampões de algodão hidrofóbico. Esses tubos foram esterilizados a 121 °C por 20 minutos e dispostos de maneira inclinada. Após a solidificação total do meio foram feitas estrias em sua superfície com o auxílio de uma alça de inoculação estéril. Com essa técnica pode-se observar que a quantidade de células que cresceram foi abundante formando colônias com o bordo nítido e de consistência viscosa.

A inoculação em meio líquido ocorreu uma semana após a realização dos repiques. Para isso foram retiradas partes da massa de células que se encontrava em meio sólido e inoculadas em Erlenmeyers contendo 5 mL de meio líquido BBM. Em períodos regulares de 10 dias o volume de meio de cultivo foi dobrado para promover o crescimento do micro-organismo e manter a disponibilidade de nutrientes. As culturas foram transferidas para recipientes de maior volume até entrarem em fase exponencial de crescimento e estarem viáveis para realização dos experimentos. Durante esse período, as condições de cultivo foram 25 °C, 15 $\mu\text{mol.m}^{-2}.\text{s}^{-1}$ de luminosidade e agitação de 70 rpm até volumes de 100 mL e por borbulhamento para volumes maiores. Aproximadamente após 90 dias de cultivo, quantidade suficiente de inóculo em fase exponencial de crescimento estava disponível para iniciar os experimentos. Cabe comentar que em todas as etapas desse processo, o material utilizado foi esterilizado e os recipientes foram sempre manuseados em ambiente estéril.

1.3. Fotobiorreator e controle das condições experimentais

Os experimentos foram conduzidos em fotobiorreatores do tipo coluna de bolhas construídos em vidro com 5 mm de espessura, 8,0 cm de diâmetro interno, 80,0 cm de altura, 3,0 L de volume de trabalho e um dispersor de ar (pedra porosa de 2,5 cm de diâmetro) localizado no centro da base da coluna. A câmara de fotoperíodo, em que os reatores foram instalados, contem 32 lâmpadas fluorescentes de 40 W conectadas em paralelo (General Eletric), sendo que diferentes combinações do número e posicionamento das lâmpadas forneceram a intensidade luminosa desejada em cada condição testada. A aeração e agitação dos fotobiorreatores foram obtidas a partir da adição de 1 VVM de ar com diferentes porcentagens de dióxido de carbono, sendo as

vazões de ar e CO₂ fornecidas por um compressor de ar da marca Schulz (MSV12/175 odontológico) e por um cilindro de gás industrial (White Martins), respectivamente. A **Figura 3.1** apresenta o esquema do fotobiorreator utilizado nos experimentos.

A intensidade luminosa foi determinada usando um luxímetro digital (Minipa MLM 1010, precisão de $\pm 4\%$) que avalia a intensidade luminosa incidente na superfície externa do reator. A temperatura foi controlada usando um termostato e um sensor polarográfico (Mettler Toledo, série InPro5000) que indicou as medidas de temperatura e concentração de CO₂ na fase líquida. O fluxo de dióxido de carbono e ar foi determinado usando rotâmetros (AFSG 100 Key Instruments precisão de $\pm 5\%$).

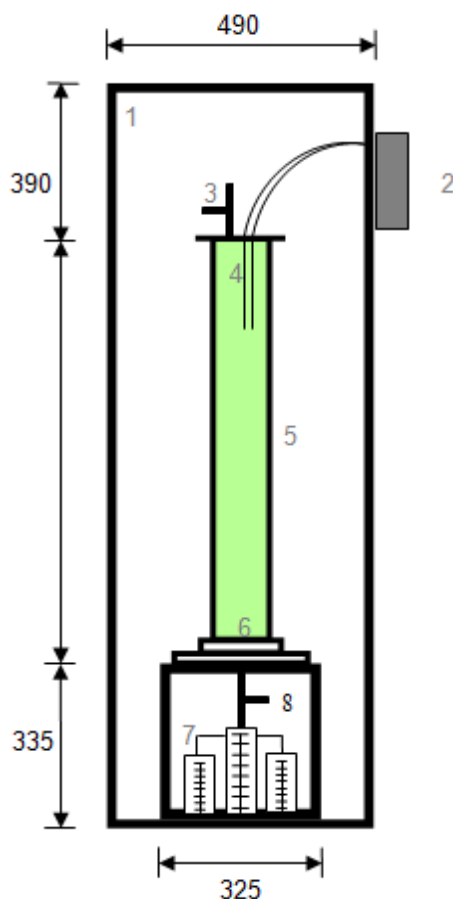


Figura 3.1: Diagrama do fotobiorreator.

1: Câmara de fotoperíodo; 2: Analisador de CO₂ e T; 3: Ponto de amostragem da saída dos gases; 4: Sensor de T e CO₂; 5: Fotobiorreator; 6: Difusor de gases; 7: Rotâmetros; 8: Ponto de amostragem da entrada dos gases. Todas as dimensões em mm.

1.4. Ensaios realizados

Foram realizadas 4 sequencias de experimentos, como apresentado na **Figura 3.2**. Na primeira etapa, a otimização das condições de cultivo (Temperatura, Intensidade luminosa e %CO₂) foi avaliada a partir de um delineamento composto central rotacional (DCCR) com posterior validação do modelo. Na segunda etapa foram testadas 5 concentrações iniciais de NaNO₃ para verificação do impacto da disponibilidade de nitrogênio nos parâmetros de crescimento, acúmulo de lipídios e padrão de qualidade do biodiesel. Na etapa seguinte foram avaliados 42 experimentos de floculação para maximizar a eficiência de recuperação da biomassa. Por último foram conduzidos 3 experimentos com diferentes intensidades luminosas para avaliação da distribuição de luz no interior dos fotobiorreatores.

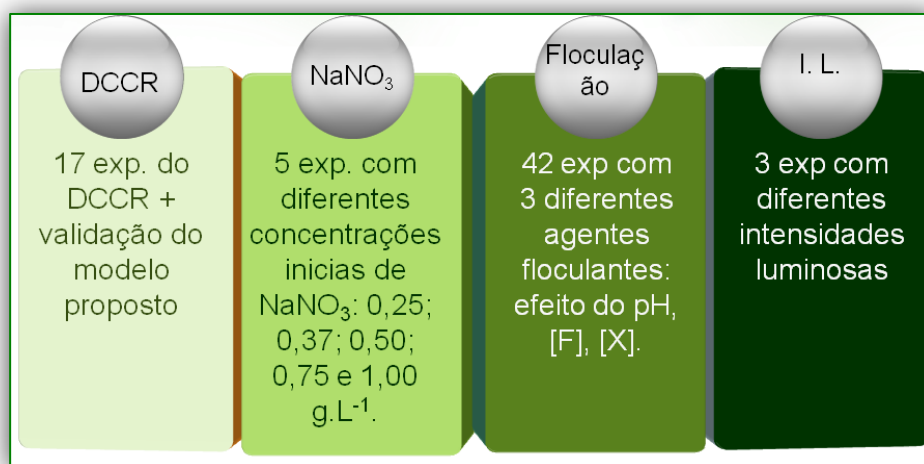


Figura 3.2: Sequencia de experimentos conduzidos durante o trabalho.

1.4.1. Determinação das condições de cultivo

Os experimentos foram realizados segundo um delineamento composto central rotacional (DCCR), sendo testadas temperaturas entre 18 e 42 °C, intensidades luminosas entre 4 e 203 $\mu\text{mol.m}^{-2}.\text{s}^{-1}$ e vazão de CO₂ de 0,038 (ar) a 40%. A **Tabela 3.2**

Tabela 3.2: apresenta os níveis estudados e a **Tabela 3.3** as condições dos ensaios realizados.

Tabela 3.2: Codificação das Variáveis do DCCR.

Código	-1,68	-1	0	1	1,68
Temperatura (°C)	18,2	23	30	37	41,8
CO₂ (%)	0,038 (ar)*	0,038 (ar)	15	30	40,2
I L (μmol.m⁻².s⁻¹)	4,0	44,4	103,6	162,8	203,2

* A codificação -1,68 (%CO₂) representaria uma concentração negativa de CO₂, sendo realizado na mínima condição possível -1 (ar).

Tabela 3.3: Matriz Codificada do DCCR.

Experimento	Intensidade Luminosa	Concentração de CO₂	Temperatura
E1	-1	-1	-1
E2	-1	-1	1
E3	-1	1	-1
E4	-1	1	1
E5	1	-1	-1
E6	1	-1	1
E7	1	1	-1
E8	1	1	1
E9	-1,68	0	0
E10	1,68	0	0
E11	0	-1	0
E12	0	1,68	0
E13	0	0	-1,68
E14	0	0	1,68
E15 (C)	0	0	0
E16 (C)	0	0	0
E17 (C)	0	0	0

Para as variáveis Temperatura e Luminosidade os valores de α foram -1,68 e +1,68 conforme as condições de rotabilidade e para a variável %CO₂ o nível superior foi de +1,68, no entanto não foi possível a realização na condição codificada igual a -1,68 (nível inferior) que representaria uma concentração negativa de CO₂, sendo realizado em -1 (ar).

Os experimentos foram iniciados com 3,0 L de BBM, inoculo de $0,1 \text{ g.L}^{-1}$ de *C. vulgaris* na fase exponencial de crescimento. O fotobiorreator operou em regime de batelada com alimentação contínua de CO_2 . Os dados experimentais foram monitorados a cada 12h de cultivo celular, avaliando concentração celular e pH.

1.4.2. Impacto da disponibilidade de nitrogênio no cultivo da *Chlorella*

Diferentes concentrações iniciais de NaNO_3 foram testadas: 0,25; 0,37; 0,50; 0,75 e $1,00 \text{ g.L}^{-1}$. As condições de cultivo foram 26°C , 8,5% CO_2 e $108 \mu\text{mol.m}^{-2}.\text{s}^{-1}$. Os experimentos foram iniciados com 3,0 L de BBM, inoculo de $0,1 \text{ g.L}^{-1}$ de *C. vulgaris* na fase exponencial de crescimento. O fotobiorreator operou em regime de batelada com alimentação contínua de CO_2 . Os dados experimentais foram monitorados a cada 12h de cultivo celular, avaliando concentração celular, pH, quantidade de lipídios e perfil de ácidos graxos.

1.4.3. Avaliação da disponibilidade de luz no interior de fotobiorreatores

Diferentes disponibilidades de luz foram avaliadas: 108, 420 e $700 \mu\text{mol.m}^{-2}.\text{s}^{-1}$. As condições de cultivo foram 26°C , 8,5 % CO_2 e $0,25 \text{ g.L}^{-1}$ de NaNO_3 . Os experimentos foram iniciados com 3,0 L de BBM, inoculo de $0,1 \text{ g.L}^{-1}$ de *C. vulgaris* na fase exponencial de crescimento. O fotobiorreator operou em regime de batelada com alimentação contínua de CO_2 . Os dados experimentais foram monitorados a cada 12h de cultivo, avaliando concentração celular, pH, morfologia e pigmentos fotossintéticos.

1.4.4. Separação da biomassa

A biomassa utilizada nos ensaios de floculação foi obtida em fotobiorreatores operando a 26°C , 8,5% CO_2 , $108 \mu\text{mol.m}^{-2}.\text{s}^{-1}$ e em regime de batelada com

alimentação contínua de CO₂. A concentração celular foi monitorada e a biomassa coletada após a detecção do início da fase estacionária de crescimento celular.

Um equipamento Jar-Test Microcontrolado marca Nova Ética, Modelo 218/LDB06, (**Figura 3.3**), foi utilizado conforme descrito na **Tabela 3.4**. As soluções dos floculantes foram preparadas como detalhado na **Tabela 3.5**.

A **Tabela 3.6** apresenta as condições avaliadas com os diferentes agentes floculantes. Para todas as condições experimentais, a velocidade de mistura rápida (V_{mr}) foi 200 rpm e as de floculação (V_f) foram 50, 30 e 20 rpm. Os tempos de mistura rápida (T_{mr}) e de floculação (T_f) foram 2 min e 15 min (5 min por RPM escolhido), respectivamente. Os intervalos de tempos de sedimentação foram escolhidos para garantir a obtenção dos dados para cada floculante em cada condição testada.

Tabela 3.4: Etapas dos ensaios de floculação.

Etapa	Descrição
1	Caracterizar o início dos ensaios relação aos seguintes parâmetros: pH, concentração da biomassa, imagens microscópicas das células.
2	Preparar as soluções de agente coagulante, NaOH 1 mol.L ⁻¹ e HCl 1 mol.L ⁻¹ .
3	Encher os jarros com 1 L de cultura contendo a concentração celular inicial desejada.
4	Colocar os volumes correspondentes às dosagens dos produtos nos dispositivos de adição simultânea de produtos químicos do Jar Test.
5	Colocar os recipientes de descarte e coleta de amostra de água decantada nas respectivas posições do equipamento.
6	Acionar os agitadores e ajustar a rotação desejada.
7	Acionar, conforme a necessidade de variação do pH, o alcalinizante ou acidificante.
8	Após a correção do pH, ajustar a rotação correspondente à velocidade de mistura rápida (V_{mr}) estabelecida.
9	Adicionar aos jarros o volume pré-estabelecido do coagulante contido nas cubetas do suporte frontal.
10	Reduzir a rotação do equipamento para o valor correspondente à velocidade de mistura lenta (V_{ml}), após o tempo de mistura rápida (T_{mr}).
11	Paralisar o equipamento após o tempo de mistura lenta (T_{ml}).
12	Iniciar a coleta das amostras após 60 minutos de sedimentação.

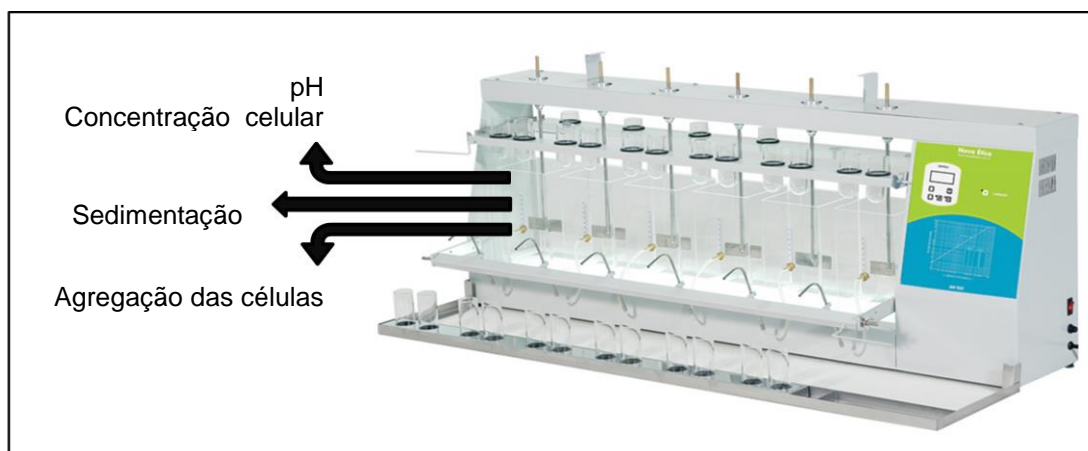


Figura 3.3: Foto do equipamento Jar Test.

Tabela 3.5: Modo de preparo das soluções de agente floculante.

Floculante	Modo de preparo
$\text{Al}_2(\text{SO}_4)_3$	Foram dissolvidos 10 g de sulfato de alumínio ($[\text{Al}_2(\text{SO}_4)_3]$ - Ecibra) em água destilada e o volume ajustado para 1 L, para obtenção da solução padrão de sulfato de alumínio 1 % (m/v).
FeCl_3	Foram dissolvidos 10 g de cloreto férrico ($[\text{FeCl}_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}]$ - Ecibra) em água destilada e o volume ajustado para 1 L, para se obter a solução padrão de cloreto férrico 1 % (m/v).
Orgânico	Em 1 litro de água destilada, foi dissolvido, aos poucos, 1g do floculante orgânico, sob agitação constante de 50 rpm e à temperatura de 35-40 °C.

Tabela 3.6: Condições experimentais dos ensaios de floculação.

Floculante	Descrição dos experimentos
$\text{Al}_2(\text{SO}_4)_3$	<p>4 pHs (5,0; 7,0; 7,4; 8,0) com 0,5 $\text{g}_{\text{Biomassa}} \cdot \text{L}^{-1}$ e 0,2 $\text{g}_{\text{Al}_2(\text{SO}_4)_3} \cdot \text{L}^{-1}$</p> <p>5 doses de floculante (0,10; 0,15; 0,20; 0,25; 0,30 $\text{g} \cdot \text{L}^{-1}$) com pH 7,0 e 0,5 $\text{g}_{\text{Biomassa}} \cdot \text{L}^{-1}$</p> <p>5 concentrações de biomassa (0,1; 0,3; 0,5; 0,7; 1,0 $\text{g} \cdot \text{L}^{-1}$) com pH 7,0 e 0,20 $\text{g}_{\text{Al}_2(\text{SO}_4)_3} \cdot \text{L}^{-1}$</p>
FeCl_3	<p>4 pHs (5,0; 7,0; 9,0; 11,0) com 0,5 $\text{g}_{\text{Biomassa}} \cdot \text{L}^{-1}$ e 0,2 $\text{g}_{\text{FeCl}_3} \cdot \text{L}^{-1}$</p> <p>5 doses de floculante (0,10; 0,14; 0,17; 0,20; 0,30 $\text{g} \cdot \text{L}^{-1}$) com pH 7,0 e 0,5 $\text{g}_{\text{Biomassa}} \cdot \text{L}^{-1}$</p> <p>5 concentrações de biomassa (0,1; 0,3; 0,5; 0,7; 1,0 $\text{g} \cdot \text{L}^{-1}$) com pH 7,0 e 0,17 $\text{g}_{\text{FeCl}_3} \cdot \text{L}^{-1}$</p>
Orgânico	<p>4 pHs (4,0; 7,0; 9,0; 11,0) com 0,5 $\text{g}_{\text{Biomassa}} \cdot \text{L}^{-1}$ e 0,2 $\text{g}_{\text{Orgânico}} \cdot \text{L}^{-1}$</p> <p>5 doses de floculante (0,005; 0,010; 0,015; 0,020; 0,040 $\text{g} \cdot \text{L}^{-1}$) com pH 7,0 e 0,5 $\text{g}_{\text{Biomassa}} \cdot \text{L}^{-1}$</p> <p>5 concentrações de biomassa (0,1; 0,3; 0,5; 0,7; 1,0 $\text{g} \cdot \text{L}^{-1}$) com pH 7,0 e 0,04 $\text{g}_{\text{Orgânico}} / \text{g}_{\text{Biomassa}}$</p>

1.5. Métodos analíticos

1.5.1. Biomassa e pH

A dinâmica do pH ao longo do cultivo foi avaliada utilizando um potenciômetro (Hannna, modelo 8417).

A concentração celular foi avaliada por diferença de massa filtrando-se 20 mL de meio de cultura através de um filtro de 0.22 μm (Millipore) e secagem à 60 °C por 24 h. Cabe comentar que não foi descontando o valor das cinzas da biomassa.

A morfologia e o estado de agregação das células foram analisados a partir de um microscópio (BioVideo-Microscópio Biológico com Vídeo Acromática - Marca Bel) utilizando lentes de 4, 10, 40 e 100 vezes e as imagens foram registradas com uma câmera digital Tron-Modelo Digitron Z6s, com 6.0 mega pixels.

A quantificação dos pigmentos foi realizada a partir de amostras de 10 mL retiradas do reator a cada 12 h, filtradas e secas na ausência de luz por 24 h e a massa avaliada gravimetricamente. Os filtros foram armazenados em tubos de ensaio âmbar contendo 10 mL de acetona 90%, sendo homogeneizados por 5 minutos em vortex, refrigerados por 24 h a 8 °C, centrifugados à 5000 rpm por 20 minutos e avaliados espectrofotometricamente (Espectrofotômetro digital UV-Vis, Genesys-10 UV).

A porcentagem de lipídios foi avaliada a partir de células coletadas do reator no início da fase estacionária, centrifugadas a 8000 g por 10 min (Hettich Model Rotina 420), congeladas a -80 °C (So-Low Ultra freezer Modelo PV 85-13) e liofilizadas a -30 °C e 50 μHg (Liobras-Modelo L101). Aproximadamente 400 mg dessa biomassa liofilizada foi pesada e passou por uma pré-digestão ácida com 5 mL de HCl 2 mol.L⁻¹ a 80 °C por 1 h. A extração foi iniciada com a centrifugação (500 g por 2 min) da biomassa digerida, sendo o sobrenadante removido. O restante da amostra foi misturado com 4 mL de metanol, 2 mL de clorofórmio e 3,6 mL de água destilada, seguido de agitação por 2 min e centrifugação a 500 g por 2 min. A fase inferior foi transferida para um tubo de ensaio. O pellet foi re-extraído com a adição de 4 mL de uma solução 10% v/v metanol em clorofórmio, seguido de agitação e centrifugação (500 g por 2 min). A fase inferior foi adicionada ao tubo de ensaio e o clorofórmio removido por rotaevaporação a 75 °C (BLIGH e DYER, 1959).

A composição elementar das células foi determinada a partir de um analisador elementar CHNS/O (2400-Perkin Elmer). Amostras de 2 mg de biomassa foram oxidadas a 1000 °C, e os gases resultantes foram determinados a partir de um sensor de condutividade térmica para carbono. O padrão utilizado foi a acetanilida, com composição de 71,09% de carbono, 11,84% de oxigênio, 6,71% de hidrogênio e 10,36% de nitrogênio.

1.5.2. Análise do perfil de lipídios

A transesterificação direta foi conduzida a partir de células coletadas do reator no início da fase estacionária, centrifugadas a 8000 g por 10 min (Hettich Model Rotina 420), congeladas a -80 °C (So-Low Ultra freezer Model PV 85-13) e liofilizadas a -30 °C e 50 µHg (Liobras-Model L101). Inicialmente, 20 mg de biomassa liofilizada foi misturada a 3 mL de uma solução de metanol, ácido clorídrico e clorofórmio (10:1:1), agitada e aquecida a 90 °C por 1 h. As amostras foram resfriadas a temperatura ambiente, e tratadas com 2 mL de uma mistura de hexano e clorofórmio (4:1), seguido por agitação e centrifugação. A fase superior foi separada em um tubo de ensaio e o processo repetido 2 vezes na fase inferior (LEWIS *et al.*, 2000).

O perfil de ácidos graxos foi analisado em um cromatógrafo gasoso GC-2014 (Shimatzu) com detector por ionização de chama (FID), coluna capilar Stabilwax, 30 m, 0,25 mm I.D., 0,25 µm. Hélio foi a fase móvel utilizada com pressão de 15 psi, split 1/100, 250 °C no injetor e 300 °C no detector. A rampa de temperatura para a coluna foi: 50 °C por 2 min, gradiente de 10 °C/min até atingir 180 °C, 5 minutos em espera à 180 °C, gradiente de 5 °C/min até atingir 240 °C, totalizando 32 minutos de corrida cromatográfica. O volume injetado para cada análise foi de 1 µL. O padrão SUPELCO 37 COMPONENT FAME MIX (10mg.mL⁻¹ in CH₂Cl₂ (47885-U) contendo metil ésteres entre 4 e 24 carbonos (C4:0 to C24:1) foi utilizado para quantificar os picos os FAMES a partir do tempo de retenção.

A identificação dos FAMES foi confirmada em um cromatógrafo gasoso com detector de massas GC-2010 (Shimatzu) utilizando uma coluna capilar Stabilwax, 30 m,

0,25 mm I.D., 0,25 μ m. Para a eletroinoização foi utilizado 70 eV. Hélio foi a fase móvel utilizada com pressão de 15 psi, split 1/50, 250 °C no injetor e 300 °C no detector. A rampa de temperatura para a coluna foi: 50 °C por 2 min, gradiente de 10 °C/min até atingir 180 °C, 5 minutos em espera à 180 °C, gradiente de 5 °C/min até atingir 240 °C, totalizando 32 minutos de corrida cromatográfica. O volume injetado para cada análise foi de 1 μ L. O software GS Solution (Shimadzu, Kyoto, Japan) foi utilizado para análise dos cromatogramas juntamente com as bibliotecas Nist08 e Nist08s.

1.5.3. Sedimentação da biomassa

A taxa de sedimentação foi avaliada pela análise das fotos retiradas em diferentes instantes do processo de sedimentação. As imagens foram obtidas utilizando uma câmera digital Tron-Modelo Digitron Z6s, com 6.0 mega pixels. Após o término da etapa de sedimentação foi coletada uma amostra de aproximadamente 50 mL de cada cuba, a aproximadamente 2 cm da superfície, sendo analisadas a concentração celular e pH. Amostras da base do jarro de teste foram retiradas para análise microscópica dos aglomerados celulares (BioVideo-Microscópio Biológico com Vídeo Acromática - Marca Bel).

1.6. Avaliação dos parâmetros cinéticos

1.6.1. Crescimento celular e produtividade

A velocidade específica de crescimento, μ , é a medida de quão rápido uma população microbiana está crescendo, dessa maneira, valores altos de μ indicam elevadas taxas de crescimento microbiano. As taxas específicas de crescimento foram determinadas numericamente em função da concentração celular (X) e do tempo (t) (Equação 3.1) (AHMAD e HOLLAND, 1995):

$$\mu = \frac{1}{X} \frac{dX}{dt} \quad (3.1)$$

O cálculo dos valores máximos da velocidade específica de crescimento, μ_{\max} , é uma metodologia de tentativa-erro, que consiste na obtenção da regressão linear de melhor ajuste aos dados experimentais de *log* da concentração celular versus tempo. Cultivos que apresentem fase *lag* e/ou fase estacionária, é necessária a exclusão dos pontos iniciais e/ou finais do tempo de residência do cultivo, respectivamente. Essa exclusão se faz necessária visando determinar o coeficiente angular da reta de melhor ajuste (μ_{\max}) da fase logarítmica, satisfazendo assim as considerações iniciais que permitiram a simplificação da equação que correlaciona o balanço de material com a lei cinética (ANDERSEN, 2005).

O modelo Logístico (Equação 3.2) e o modelo Gompertz modificado (Equação 3.3) foram testados para prever o crescimento celular da *C. vulgaris* (ZWIETERING *et al.*, 1990; DA CRUZ e DO NASCIMENTO, 2012). Estes modelos foram avaliados principalmente em função: i) ajuste aos dados experimentais do DCCR; ii) número e significado físico dos parâmetros dos modelos e iii) facilidade de uso. O ajuste dos modelos aos dados experimentais foi avaliado a partir do cálculo do coeficiente de correlação, R^2 , (Equação 3.4), que é função das concentrações celulares preditas ($X_{t_predito}$) e das observadas ($X_{t_observado}$). Foi observada uma melhor correlação dos dados observados com os dados preditos pelo modelo Gompertz Modificado que foi escolhido para ser utilizado em todo o trabalho (dados não apresentados)

$$\ln\left(\frac{X_{t_predito}}{X_0}\right) = \ln\left(\frac{X_{\max}}{X_0}\right) / (1 + \exp^{-B(t-M)}) \quad (3.2)$$

$$\ln\left(\frac{X_{t_predito}}{X_0}\right) = \ln\left(\frac{X_{\max}}{X_0}\right) \cdot \exp\left(-\exp\left(\frac{\mu_{\max} \cdot \exp(1)}{\ln\left(\frac{X_{\max}}{X_0}\right)}(\lambda - t) + 1\right)\right) \quad (3.3)$$

$$R^2 = \frac{(\sum(X_{t_predito} - \overline{X_{predito}})(X_{t_observado} - \overline{X_{observado}}))^2}{\sum(X_{t_predito} - \overline{X_{predito}})^2 \sum(X_{t_observado} - \overline{X_{observado}})^2} \quad (3.4)$$

A rotina para utilização do modelo considerado (**Figura 3.3**) segue os seguintes passos: i) iniciar com uma planilha no Microsoft Excel 2007® contendo os dados experimentais (tempo e concentração celular), ii) adicionar uma coluna com os dados calculados pelo modelo em função de três células que serão variadas pelo método de resolução (μ_{\max} , X_{\max} e λ), iii) adicionar uma coluna com o cálculo dos mínimos quadrados, iv) calcular a soma dos mínimos quadrados, v) usar a função solver para minimizar o valor da célula contendo a soma dos mínimos quadrados tendo como células variáveis as células citadas no item ii (LACERDA *et al.*, 2011). O valor da estimativa inicial, que esse tipo de resolução requer, foi obtido em função do gráfico de $\ln(X)$ x t .

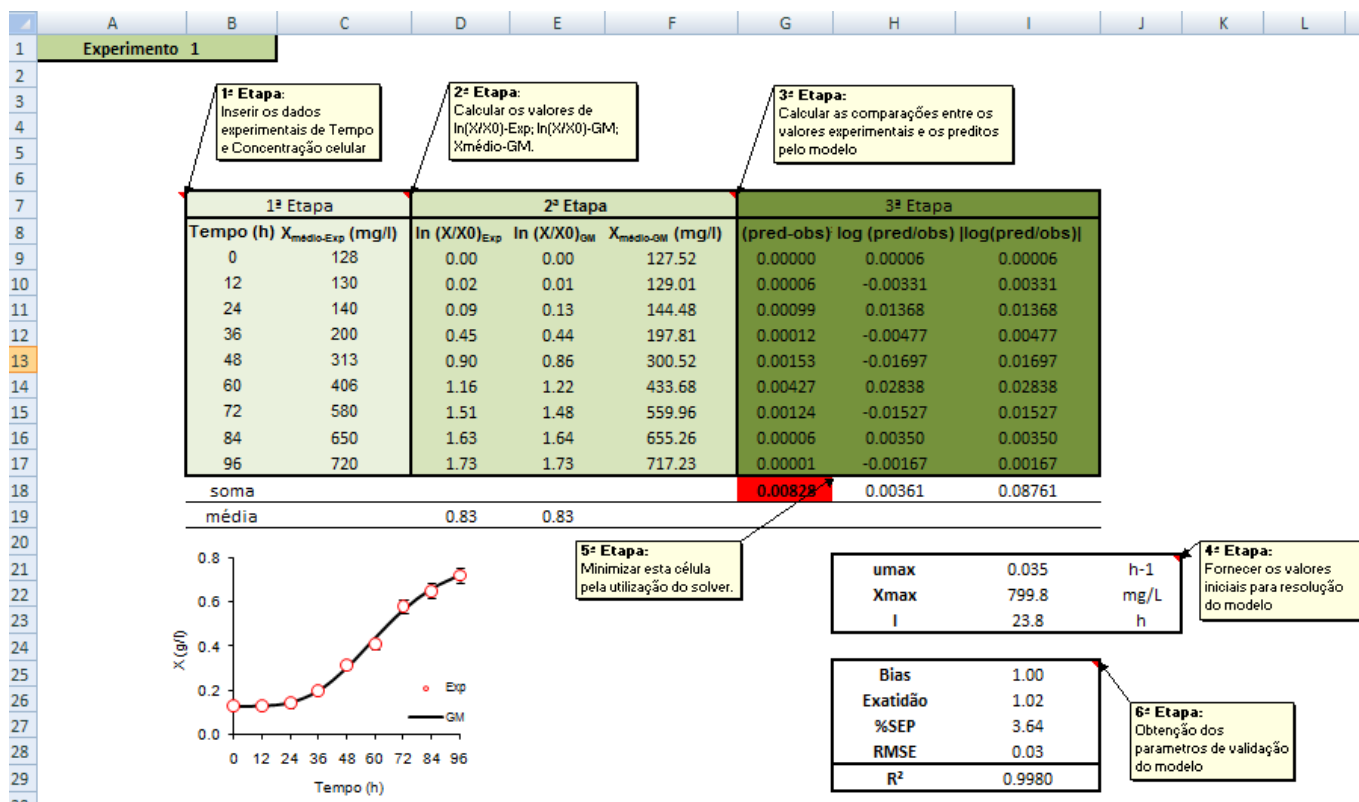


Figura 3.4: Imagem da planilha de cálculos para resolução do modelo Gompertz Modificado.

Ao lado das velocidades específicas de crescimento, a fase exponencial é frequentemente caracterizada pelo tempo de geração, t_g , que é o intervalo de tempo

necessário para dobrar o valor da concentração celular, considerando-se que a velocidade específica de crescimento é constante e máxima (ANDERSEN, 2005). Aplicando-se esta definição à Equação 3.1, separando as variáveis e realizando a integração, obtém-se:

$$tg = \frac{\ln(2)}{\mu_{max}} \quad (3.5)$$

A produtividade de biomassa (P) é função da concentração celular (X) e da velocidade específica de crescimento (μ) e necessita ser otimizada durante o desenvolvimento de um fotobiorreator para cultivo de microalgas em larga escala (MOLINA GRIMA *et al.*, 1994). Podendo ser determinada pela Equação 3.6 (ACIÉN FERNÁNDEZ *et al.*, 2001):

$$P = \mu \cdot X \rightarrow \frac{dX}{dt} \quad (3.6)$$

1.6.2. Dióxido de carbono

A incorporação de dióxido de carbono à biomassa foi calculada a partir do conteúdo de carbono presente nas células (C_c), taxa de crescimento do micro-organismo (dX/dt), massa molecular do carbono (M_c) e do dióxido de carbono (M_{CO_2}), conforme indica a Equação 3.7 (KAJIWARA *et al.*, 1997):

$$CB = C_c \cdot \left(\frac{dX}{dt} \right) \cdot \left(\frac{M_{CO_2}}{M_c} \right) \quad (3.7)$$

1.6.3. Análise de lipídios

O conteúdo lipídico (%Lipídios) foi calculado pela razão entre a massa de lipídios (W_L) e a massa seca de microalga (W_X) (CONVERTI *et al.*, 2009).

$$\%Lipídios = \frac{W_L}{W_X} \quad (3.8)$$

A produtividade lipídica (P_L) foi determinada em função do conteúdo lipídico (%Lipídios), máxima concentração celular (X_{max}) e duração da batelada (T_r) (YEH e CHANG, 2011):

$$P_L = \frac{X_{max} \cdot \%Lipids}{T_r} \quad (3.9)$$

A partir dos perfis de FAMES, obtidos nas análises cromatográficas, foram estimados os valores de alguns parâmetros que regulamentam a qualidade do biodiesel. Essas estimativas foram realizadas em função das equações apresentadas na **Tabela 3.7**.

Tabela 3.7: Parâmetros para análise de qualidade do Biodiesel.

Nome	Equação	Nº
Número Cetano	$NC = 62.2 + (0.017C_{12:0}) + (0.074C_{14:0}) + (0.115C_{16:0}) + (0.177C_{18:0}) - (0.103C_{18:1}) - (0.279C_{18:2}) - (0.366C_{18:3})$	3.10
Número Cetano	$NC = \sum \frac{NC_{ME} \%ME}{100}$	3.11
Índice de Iodo	$II = \sum \frac{254 \cdot N_L \cdot \%ME}{MM_{ME}}$	3.12
Massa Molecular	$MM = \sum \frac{MM_{ME} \%ME}{100}$	3.13
Densidade	$\rho = \sum \frac{\rho_{ME} \%ME}{100}$	3.14
Calor de Combustão	$\Delta H_c = \sum \frac{\Delta H_{c_ME} \%ME}{100}$	3.15
Índice de Est. à Oxidação	$OSI = \sum \frac{OSI_{ME} \%ME}{100}$	3.16
Lubricidade	$Lub = \sum \frac{Lub_{ME} \%ME}{100}$	3.17
Viscosidade	$\ln(v) = \sum \frac{\ln(v_{ME}) \%ME}{100}$	3.18
Ponto de Entup. de Filtro à Frio	$CFPP = 3.1417(0.1C_{16:0} + 0.5C_{18:0} + 1.0C_{20:0} + 1.5C_{22:0} + 2.0C_{24:0}) - 16.477$	3.19

Fonte: (GOPINATH *et al.*, 2009; RAMOS *et al.*, 2009).

$C_{12:0}, C_{14:0}, C_{16:0}, C_{18:0}, C_{18:1}, C_{18:2}, C_{18:3}, C_{20:0}, C_{22:0}, C_{24:0}$ são as porcentagens dos ésteres metílicos laurico, mirístico, palmítico, esteárico, oléico, linoléico, linolênico, eicosanoico, docosanoico, tetracosanoico presentes no biodiesel, respectivamente. As porcentagens e a massa molecular de cada éster metílico presente no biodiesel são representadas por $\%ME, MM_{ME}$, respectivamente. Densidade, calor de combustão, índice de estabilidade à oxidação, lubricidade e viscosidade correspondem à $\rho, \Delta H_C, OSI, Lub$ e v , respectivamente. Essas mesmas propriedades, aplicadas a cada éster metílico presente no biodiesel, correspondem à $\rho_{ME}, \Delta H_{C_ME}, OSI_{ME}, Lub_{ME}, v_{ME}$, respectivamente.

1.6.4. Disponibilidade de luz no interior do reator

A intensidade luminosa média no centro do cultivo foi calculada a partir das Equações 20 a 24 onde o coeficiente de extinção é função da concentração de pigmentos na biomassa (ACIÉN FERNÁNDEZ *et al.*, 2001; LICHTENTHALER e BUSCHMANN, 2001; SCOTT, 2001; GARCÍA-MALEA *et al.*, 2005).

$$I_{av} = \frac{I_0 \cos \theta}{K_a X d} \left[1 - \exp \left(1 - \exp \left(-k_a X \frac{d}{\cos \theta} \right) \right) \right] \quad (20)$$

$$K_a = 0,086 + 0,0065(C_a + C_b) - 0,016C_{(c+x)} \quad (21)$$

$$c_a (\mu\text{g/mL}) = 11.85 A_{664} - 1.54 A_{647} - 0.086 A_{630} \quad (22)$$

$$c_b (\mu\text{g/mL}) = 21.0 3A_{647} - 5.43 A_{664} - 2.66 A_{630} \quad (23)$$

$$c_{(x+c)} (\mu\text{g/mL}) = (1000 A_{470} - 1.9c_a - 63.14c_b) / 214 \quad (24)$$

1.6.5. Recuperação da biomassa após a floculação

A porcentagem de recuperação da biomassa foi determinada pela equação 25 (SALIM *et al.*, 2011).

$$ER (\%) = \frac{X_{(t0)} - X_{(t)}}{X_{(t0)}} 100 \quad (25)$$

2. Referencias

ACIÉN FERNÁNDEZ, F. G.; FERNÁNDEZ SEVILLA, J. M.; SÁNCHEZ PÉREZ, J. A.; MOLINA GRIMA, E.; CHISTI, Y. Airlift-driven external-loop tubular photobioreactors for outdoor production of microalgae: assessment of design and performance. **Chemical Engineering Science**, v. 56, n. 8, p. 2721-2732, 2001.

AHMAD, M. N.; HOLLAND, C. R. Growth kinetics of single-cell protein in batch fermenters. **Journal of Food Engineering**, v. 26, n. 4, p. 443-452, 1995.

ANDERSEN, R. A. **Algal culturing techniques**. Phycological Society Of America – Elsevier Academic Press, 2005.

BLIGH, E. G.; DYER, W. J. A rapid method of total lipid extraction and purification. **Canadian Journal of Biochemistry and Physiology**, v. 37, n. 8, p. 911-917, 1959.

CONVERTI, A.; CASAZZA, A. A.; ORTIZ, E. Y.; PEREGO, P.; DEL BORGHI, M. Effect of temperature and nitrogen concentration on the growth and lipid content of *Nannochloropsis oculata* and *Chlorella vulgaris* for biodiesel production. **Chemical Engineering and Processing: Process Intensification**, v. 48, n. 6, p. 1146-1151, 2009.

DA CRUZ, R. V. A.; DO NASCIMENTO, C. A. O. **Process modeling and economic analysis of microalgal systems for CO₂ capture and production of chemicals**. In: IFTEKHAR, A. K. e RAJAGOPALAN, S. (Ed.). Computer Aided Chemical Engineering: Elsevier, v. Volume 31, 2012. p.490-494.

GARCÍA-MALEA, M. C.; BRINDLEY, C.; RÍO, E. D.; ACIÉN, F. G.; FERNÁNDEZ, J. M.; MOLINA, E. Modelling of growth and accumulation of carotenoids in *Haematococcus pluvialis* as a function of irradiance and nutrients supply. **Biochemical Engineering Journal**, v. 26, n. 2-3, p. 107-114, 2005.

GOPINATH, A.; PUHAN, S.; NAGARAJAN, G. Relating the cetane number of biodiesel fuels to their fatty acid composition: A critical study. **Proceedings of the Institution of Mechanical Engineers, Part D: Journal of Automobile Engineering**, v. 223, n. 4, p. 565-583, 2009.

KAJIWARA, S.; YAMADA, H.; OHKUNI, N.; OHTAGUCHI, K. Design of the bioreactor for carbon dioxide fixation by *Synechococcus* PCC7942. **Energy Conversion and Management**, v. 38, Supplement, n. 0, p. S529-S532, 1997.

LEWIS, T.; NICHOLS, P. D.; MCMEEKIN, T. A. Evaluation of extraction methods for recovery of fatty acids from lipid-producing microheterotrophs. **Journal of Microbiological Methods**, v. 43, n. 2, p. 107-116, 2000.

LICHTENTHALER, H. K.; BUSCHMANN, C. **Chlorophylls and Carotenoids: Measurement and Characterization by UV-VIS Spectroscopy**. In: (Ed.). Current Protocols in Food Analytical Chemistry: John Wiley & Sons, Inc., 2001.

MOLINA GRIMA, E.; SÁNCHEZ PÉREZ, J. A.; GARCÍA CAMACHO, F.; GARCÍA SÁNCHEZ, J. L.; ACIÉN FERNÁNDEZ, F. G.; LÓPEZ ALONSO, D. Outdoor culture of *Isochrysis galbana* ALII-4 in a closed tubular photobioreactor. **Journal of Biotechnology**, v. 37, n. 2, p. 159-166, 1994.

RAMOS, M. J.; FERNANDEZ, C. M.; CASAS, A.; RODRIGUEZ, L.; PEREZ, A. Influence of fatty acid composition of raw materials on biodiesel properties. **Bioresour Technol**, v. 100, n. 1, p. 261-8, 2009.

SALIM, S.; BOSNA, R.; VERMUË, M. J.; WIJFFELS, R. H. Harvesting of microalgae by bio-flocculation. **J. Appl. Phycol.**, v. 23, n. 5, p. 849–855, 2011.

SCOTT, K. J. **Detection and Measurement of Carotenoids by UV/VIS Spectrophotometry**. In: (Ed.). Current Protocols in Food Analytical Chemistry: John Wiley & Sons, Inc., 2001.

STEIN, J. R. **Handbook of phycological methods. Culture methods and growth measurements**. London: Cambridge University Press, 1973. 1-448

YEH, K.-L.; CHANG, J.-S. Nitrogen starvation strategies and photobioreactor design for enhancing lipid content and lipid production of a newly isolated microalga *Chlorella vulgaris* ESP-31: Implications for biofuels. **Biotechnology Journal**, p. n/a-n/a, 2011.

ZWIETERING, M. H.; JONGENBURGER, I.; ROMBOUTS, F. M.; VAN 'T RIET, K. Modeling of the bacterial growth curve. **Appl Environ Microbiol**, v. 56, n. 6, p. 1875-81, 1990.

CAPÍTULO 4

STATISTICAL OPTIMIZATION OF BIOMASS GROWTH AND CO₂ MITIGATION: EFFECT OF LIGHT INTENSITY, TEMPERATURE AND CO₂ FEEDING

*SUBMETIDO EM 2013 À EDIÇÃO ESPECIAL DO ALGAL RESEARCH
JOURNAL - ELSEVIER*

Statistical optimization of biomass growth and CO₂ mitigation: Effect of light intensity, temperature and CO₂ feeding

Lucy Mara Cacia Ferreira Lacerda and Telma Teixeira Franco*

* School of Chemical Engineering, State University of Campinas, UNICAMP, 13083-970 Campinas-SP, Brazil, phone +55 (19) 3521 3966. E-mail: franco@feq.unicamp.br (T.T. Franco*).

Highlights

1. Use of response surface methodology to maximize *C. vulgaris* production;
2. Simultaneously optimization of cell growth and CO₂ mitigation using desirability;
3. Use of a factorial design (CCRD) to reduce cost and time of experiments;
4. Impact of light intensity, nutrient availability and temperature on cell culture;

Abstract

The most environmentally sustainable way to reduce CO₂ emissions is to generate energy from renewable sources. Currently, microalgae biomass production is receiving great attention because can associate CO₂ mitigation and clean energy production (biodiesel, CH₄, H₂ and ethanol). In this sense, a factorial design associated with response surface methodology (RSM) and a multi-criteria method (desirability function) were used to select light intensity, nutrient availability (CO₂) and temperature that simultaneously optimize biomass growth (X_{\max}/X_0 ; μ_{\max} ; λ ; P_{\max} ; P_{mean}) and CO₂ mitigation parameters (CB_{\max} ; CB_{mean}). The optimized conditions for *Chlorella vulgaris* cultivated in bubble columns photobioreactors are 108 $\mu\text{mol.m}^{-2}.\text{s}^{-1}$, 26.5°C and 8.05% of CO₂ being possible to obtain: $X_{\max}/X_0=14.78$; $\mu_{\max}=1.02\text{d}^{-1}$; $\lambda=0.50\text{d}$; $P_{\max}=0.58\text{g.L}^{-1}.\text{d}^{-1}$; $P_{\text{mean}}=0.31\text{ g.L}^{-1}.\text{d}^{-1}$; $CB_{\max}=1.06\text{ g.L}^{-1}.\text{d}^{-1}$; $CB_{\text{mean}}=0.55\text{ g.L}^{-1}.\text{d}^{-1}$. These results show the potential use of *Chlorella vulgaris* to mitigate CO₂ and produce biomass that could be used to generate renewable energy.

Corresponding author: Department of Process Engineering, School of Chemical Engineering, State University of Campinas, UNICAMP, Campinas-SP, Brazil, phone +55 (19) 3521 3966.
E-mail address: franco@feq.unicamp.br (T.T. Franco*).

Keywords: *Chlorella vulgaris*, biomass optimization, desirability function, surface methodology response.

1. Introduction

Carbon dioxide is the most important anthropogenic greenhouse gas in terms of annual emissions and its increased atmospheric concentration is widely being considered as the main driving factor that causes the phenomenon of global warming (FLORIDES e CHRISTODOULIDES, 2009). Reducing the CO₂ atmospheric emissions is today's demand in order to reduce the impact of this gas on global warming (KUMAR *et al.*, 2011).

There are three options to reduce total CO₂ emission into the atmosphere, i) to reduce energy intensity by efficient use of energy, ii) to reduce carbon intensity, switching to using non-fossil fuels such as hydrogen and renewable energy, iii) to enhance the mitigation of CO₂ by the development of technologies to capture and sequester more CO₂ (YANG *et al.*, 2008). In this sense, biological CO₂ mitigation through microalgae growth receives increased attention (KUMAR *et al.*, 2011), since microalgae biomass production can be combined with direct bio-fixation of waste CO₂ (1 kg of dry algal biomass requiring about 1.8 kg of CO₂) (RODOLFI *et al.*, 2009) and the biomass used to produce renewable energy as biodiesel, CH₄, H₂ and ethanol (TABERNERO *et al.*, 2012).

Microalgae are sunlight cell factories that photosynthetic growth requires light, carbon dioxide, water and inorganic salts producing oxygen and biomass with high value-added co-products such as single-cell protein, carotenoids, chlorophyll, enzymes, vitamins, lipids (PULZ e GROSS, 2004; RICHMOND, 2004), and molecules with pharmacological activities (DERNER *et al.*, 2006). Microalgae cultivation does not compete for resources with conventional agriculture and it can be done in non arable lands using wastewater as source of nitrogen and phosphorus (RODOLFI *et al.*, 2009). However, limitations in the process need to be addressed and microalgae cultures optimized to enable large scale production.

Light, temperature and nutrient availability are key parameters to be optimized in microalgae cultures with focus on biomass growth and carbon dioxide mitigation. In this sense, a CCRD associated with RSM and a D_f are a powerful tools to optimize the culture conditions and promote many advantages such as: i) reduce the number and costs of experiments, ii) minimize the material resources and time to obtain the final analysis, iii) analyze the effect of interactions among experimental variables within the range studied, and iv) facilitate the determination of the operating conditions necessary for the scale-up of the process (RODRIGUES e IEMMA, 2009; PINZI *et al.*, 2010).

Several studies were carried out to analyze *C. vulgaris* cultures trying to optimize biomass growth, carbon dioxide mitigation, lipid accumulation, pigments and proteins production or even a combination of these parameters (YEH *et al.*, 2010; BHOLA *et al.*, 2011; SHARMA *et al.*, 2011; ANJOS *et al.*, 2013), but it is important to say that, as those characteristics are directly dependent of microorganism specie and culture conditions (nutrient source and availability, temperature, light source and availability, pH, salinity, others), it is difficult to compare the literature results.

The aim of this study was to optimize simultaneously biomass growth and carbon dioxide mitigation by *C. vulgaris* using a central composite rotatable design (CCRD), a response surface methodology (RSM) and a multi-criteria function as desirability (D_f). The impact of light intensity, nutrient availability and temperature were also evaluated.

2. Material and Methods

2.1. Microalgae

Stock cultures of *C. vulgaris* (CPCC 90) were propagated and maintained in synthetic BBM medium (STEIN, 1973) whose composition is shown in **Table 4.1**. The incubation conditions used were 25 °C, a photon flux density of 15 $\mu\text{mol.m}^{-2}.\text{s}^{-1}$, and constant aeration by bubbling.

Table 4.1: BBM synthetic medium composition (pH 6.8).

Parameter	Value (g.L ⁻¹)	Parameter	Value (g.L ⁻¹)
Na ₂ EDTA	0.050	Fe ₂ SO ₄ .7H ₂ O	0.00498
KOH	0.003	H ₂ SO ₄ (μL/L)	1
CaCl ₂ .2H ₂ O	0.025	H ₃ BO ₃	0.01142
MgSO ₄ .7H ₂ O	0.075	ZnSO ₄ .7H ₂ O	0.00882
K ₂ HPO ₄	0.075	MnCl ₂ .4H ₂ O	0.00144
KH ₂ PO ₄	0.175	CuSO ₄ .5H ₂ O	0.00157
NaCl	0.025	Co(NO ₃) ₂ .6H ₂ O	0.00049
NaNO ₃	0.250	MoO ₃	0.00071

2.2. Culture system

The experiments were carried out in a bubble column photobioreactor (JACOB-LOPES *et al.*, 2008). The system was built with 4 mm thick glass, had an internal diameter of 8.0 cm, a height of 80 cm, and a nominal working volume of 3.0 L. The dispersion system for the reactor consisted of a 1.5 cm diameter air diffuser located in the centre of the column. The reactor was continuously illuminated with sixteen 40 W fluorescent daylight-type tubes (General Electric, Brazil), connected in parallel and located in a photoperiod chamber. Airflow into the photobioreactor was provided via a filtered air and pure CO₂ cylinder (Praxair, Inc, Brazil) through Teflon tubing. The CO₂/air mixture was adjusted to achieve the desired concentration of carbon dioxide in the air-stream through rotameters that measured the flow rates of the carbon dioxide and the air, respectively.

2.3. Optimizing the culture conditions

The culture conditions optimization follows the steps described in **Table 4.2**. The experiments were carried out in isothermal bioreactors operating with 3.0 L of synthetic BBM medium. The experimental conditions were as follows: an initial cell concentration of 0.1 g.L⁻¹, temperatures between 18 and 42 °C, light intensities between 4 and 192

$\mu\text{mol.m}^{-2}.\text{s}^{-1}$ and continuous aeration of 1 VVM with the injection of air containing up to 40% of CO_2 . The cell concentration and pH were monitored every 12 h during the microbial growth phases. Residence times of up to 96h were adopted for the experiments. The tests were carried out in duplicate and the kinetic data refers to the mean of four repetitions.

Table 4.2: Steps to perform a culture conditions optimization.

Step	Description
1	Variable selection (Independent and dependent).
2	Selection of experimental conditions using a CCRD.
3	Carry out the laboratory tests.
4	Statistical analyzes and use of response surface methodology.
5	Evaluation of multi-criteria method to optimize all dependent variables simultaneously.
6	Experimental validation in optimal conditions.

2.4. Analytical methods

The photon flux density was determined using a digital photometer (Spectronics, model XRP3000), measuring the incident light on the external reactor surface. The temperature was controlled using thermostats and measured using a polarographic probe (Mettler Toledo, InPro5000 series). The flow rates of the carbon dioxide and air were determined using rotameters (AFSG 100 Key Instruments).

Cell concentration was evaluated gravimetrically by filtering a known volume of culture medium through a $0.22 \mu\text{m}$ filter and drying at 60°C for 24 hours. Stationary phase cells were harvested by centrifugation at 8000g for 10 min (Hettich Model Rotina 420), frozen at -80°C (So-Low Ultra freezer Model PV 85-13), and freeze-dried at -30°C and 50 mHg (Liobras-Model L101) for lipid analysis. The elemental composition of the *C. vulgaris* cells was determined using a Perkin Elmer 2400 CHNS/O element analyzer. Two-milligram samples of biomass were oxidized at 1000°C and the resulting gases were determined using a thermal conductivity probe for carbon, nitrogen and hydrogen. The standard used was acetanilide, with a composition of 71.09% carbon, 11.84% oxygen, 6.71% hydrogen and 10.36% nitrogen.

2.5. Kinetic parameters analysis

Lag phase duration (λ , h), maximum specific growth rate (μ_{\max} , h^{-1}), and maximum cell concentration (X_{\max} , $g.L^{-1}$) were predicted by the modified Gompertz model represented below (ZWIETERING *et al.*, 1990) as a function of initial cell concentration (X_0 , $g.L^{-1}$) and cell concentration ($X_{t_predicted}$, $g.L^{-1}$) at different times (t, h):

$$\ln\left(\frac{X_{t_predicted}}{X_0}\right) = \ln\left(\frac{X_{\max}}{X_0}\right) \cdot \exp\left(-\exp\left(\frac{\mu_{\max} \cdot \exp(1)}{\ln\left(\frac{X_{\max}}{X_0}\right)}(\lambda - t) + 1\right)\right) \quad (4.1)$$

The Newton-Raphson method was used to solve Equation (1) using Microsoft Excel 7 software and find the values of the parameters that minimize the sum of the root mean square error between the observed and predicted values. Initial estimates of the parameters were required, and the choice of these values is critical because a poor starting point can result in divergence or an incorrect solution (LACERDA *et al.*, 2011). A reasonable initial estimate for the coefficient was obtained through the graph ($\ln X$) vs. (t).

The coefficient of determination (R^2) is an optimistic estimate of the quality of a linear regression between the predicted values ($X_{t_predicted}$, $g.L^{-1}$) and the observed values ($X_{t_observed}$, $g.L^{-1}$). This parameter was used to validate the model results.

$$R^2 = \frac{(\sum(X_{t_predicted} - \overline{X_{predicted}})(X_{t_observed} - \overline{X_{observed}}))^2}{\sum(X_{t_predicted} - \overline{X_{predicted}})^2 \sum(X_{t_observed} - \overline{X_{observed}})^2} \quad (4.2)$$

The biomass productivity (P , $g.L^{-1}.d^{-1}$) is a relation between the cell mass concentration (X , $g.L^{-1}$) and time (t, d), according to the Equation 3 (ACIÉN FERNÁNDEZ *et al.*, 2001):

$$P = \frac{\Delta X}{\Delta t} \quad (4.3)$$

Carbon mitigation is analyzed as a carbon dioxide incorporation rate (CB, $g.L^{-1}.d^{-1}$) was calculated as a function of biomass elemental analysis (carbon content - C_c , %w/w), molecular weight of carbon (M_C , $g.mol^{-1}$), carbon dioxide (M_{CO_2} , $g.mol^{-1}$), and maximum productivity (P_{\max} , $g.L^{-1}.d^{-1}$), as indicated in Equation 4 (KAJIWARA *et al.*, 1997):

$$CB = C_c P_{max} \left(\frac{M_{CO_2}}{M_c} \right) \quad (4.4)$$

3. Results and discussions

The independent variables chosen were light intensity (X_1), %CO₂ injected in the bioreactor (X_2) and temperature (X_3) because they are the main parameters affecting cell growth (KUMAR *et al.*, 2011) and CO₂ mitigation. To fix the range of the independent variables was carried out a research in scientific articles with phototrophic *Chlorella* (HIRATA *et al.*, 1996; MCEVOY *et al.*, 2004; ALYABYEV *et al.*, 2007; BERTOLDI *et al.*, 2008; FAN *et al.*, 2008; POWELL *et al.*, 2009; KONG *et al.*, 2010; ONG *et al.*, 2010; RAMANAN *et al.*, 2010) and the ranges selected were: 18 to 42 °C, 4 to 192 $\mu\text{mol.m}^{-2}.\text{s}^{-1}$ and air to 40% of CO₂ injected in the bioreactor.

A CCRD was used in order to reduce the number and costs of experiments, and minimize the material resources and time to obtain the final analysis. The experiments were carried out in randomized order to minimize the effects of unexplained variability in the observed responses due to extraneous factors (KOOCHKEI *et al.*, 2009). Three repetitions were performed at the center point to provide a measure of the error and stabilize the variance of the expected response (BARROS NETO *et al.*, 2003). The experimental design matrix and all results obtained were shown in **Table 4.3**. In all cases, the fraction of carbon in the cells of *Chlorella vulgaris* was approximately 0.5 and this value was used to estimate carbon dioxide incorporation rate.

Quantitatively, the $X_{\text{max}}/X_{\text{initial}}$ ratio ranged from 1.13 to 14.93, μ_{max} rate ranged from 0.01 to 0.96 d^{-1} , λ between 0.00 and 2.00 d, P_{max} from 0.02 to 0.58 $\text{g.L}^{-1}.\text{d}^{-1}$, P_{mean} from 0.00 to 0.027 $\text{g.L}^{-1}.\text{d}^{-1}$, CB_{max} ranged from 0.04 to 1.06 $\text{g.L}^{-1}.\text{d}^{-1}$, and CB_{mean} ranged from 0.01 to 0.49 $\text{g.L}^{-1}.\text{d}^{-1}$. The profiles of cell concentration, biomass productivity and carbon dioxide incorporation rates for each experiment as presented in **Figure 4.1**. In all cases, the modified Gompertz model showed good correlation between predicted and observed data ($R^2 > 0.97$).

Table 4.3: Growth and carbon incorporation parameters analyzed with *C. Vulgaris* cultured with different T, LI, and %CO₂.

Exp.	LI ($\mu\text{E.m}^{-2}.\text{s}^{-1}$)	CO ₂ (%)	Temp (°C)	X _{max} /X ₀ (g.L ⁻¹)	μ_{max} (d ⁻¹)	λ (d)	P _{max} (g.L ⁻¹ .d ⁻¹)	P _{mean} (g.L ⁻¹ .d ⁻¹)	CB _{max} (g.L ⁻¹ .d ⁻¹)	CB _{mean} (g.L ⁻¹ .d ⁻¹)
1	42.0	0.0	23.0	5.65	0.70	0.99	0.35	0.13	0.64	0.24
2	42.0	0.0	37.0	1.34	0.14	1.50	0.02	0.01	0.04	0.01
3	42.0	30.0	23.0	2.00	0.70	0.99	0.09	0.03	0.16	0.05
4	42.0	30.0	37.0	1.81	0.19	0.50	0.10	0.00	0.18	0.01
5	154.0	0.0	23.0	7.66	0.84	0.50	0.43	0.20	0.78	0.37
6	154.0	0.0	37.0	3.50	0.91	0.00	0.28	0.09	0.51	0.16
7	154.0	30.0	23.0	5.71	0.86	2.00	0.30	0.11	0.55	0.20
8	154.0	30.0	37.0	1.58	0.14	0.50	0.06	0.01	0.11	0.01
9	3.8	15.0	30.0	1.60	0.41	0.50	0.06	0.01	0.11	0.03
10	192.2	15.0	30.0	3.72	0.72	0.50	0.20	0.07	0.37	0.12
11	98.0	0.0	30.0	14.93	0.96	0.50	0.58	0.26	1.06	0.47
12	98.0	40.2	30.0	6.40	0.60	0.50	0.21	0.09	0.38	0.16
13	98.0	15.0	18.2	9.14	0.82	0.50	0.50	0.19	0.92	0.35
14	98.0	15.0	41.8	1.13	0.01	0.00	0.03	0.00	0.06	0.00
15	98.0	15.0	30.0	14.00	0.94	0.50	0.50	0.27	0.92	0.49

Light intensity effect: In quantities above of saturation limit, additional light is not used by microalgae and may be responsible for the phenomenon of photoinhibition (KUMAR *et al.*, 2011). However, in quantities below of saturation limit, the metabolism is directly proportional to the light availability, existing photolimitation (RADMER, 1996). Comparing the experiments carried out with 30°C; 15%CO₂ and 4, 98 and 192 $\mu\text{mol.m}^{-2}.\text{s}^{-1}$, better results occurred for 98 $\mu\text{mol.m}^{-2}.\text{s}^{-1}$ (X_{max}/X₀=14.0; μ_{max} =0.94 d⁻¹; P_{max}=0.50g.L⁻¹.d⁻¹; P_{mean}=0.27 g.L⁻¹.d⁻¹; CB_{max}=0.92 g.L⁻¹.d⁻¹; CB_{mean}=0.49 g.L⁻¹.d⁻¹). For *Chlorella* species, saturation and compensation points occur at 120 and 20 $\mu\text{mol.m}^{-2}.\text{s}^{-1}$, respectively (LLOYD *et al.*, 1977). In this sense, it is possible to conclude that negative growth, photolimitation and photoinhibition occurred during the experiments with 4, 98 and 192 $\mu\text{mol.m}^{-2}.\text{s}^{-1}$, respectively.

Temperature effect: Temperature is one of the most critical parameters to be controlled (RICHMOND, 2004; WANG e ZHONG, 2007), because influence cellular processes affecting photosynthetic capacity, growth and respiration of microalgae (ROBARTS e ZOHARY, 1987). Usually microalgae cultivation temperatures vary between 16 and 37°C, and has reduced activity at temperatures lower than 16°C and

cell death occurring in crops with temperatures above 37°C (BARSANTI e GUALTIERI, 2006). Comparing the experiments carried out with 98 $\mu\text{mol.m}^{-2}.\text{s}^{-1}$, 15 % CO_2 and 18, 30 and 42 °C, better results occurred for 30 °C ($X_{\text{max}}/X_0=14.0$; $\mu_{\text{max}}=0.94 \text{ d}^{-1}$; $P_{\text{max}}=0.50\text{g.L}^{-1}.\text{d}^{-1}$; $P_{\text{mean}}=0.27 \text{ g.L}^{-1}.\text{d}^{-1}$; $\text{CB}_{\text{max}}=0.92 \text{ g.L}^{-1}.\text{d}^{-1}$; $\text{CB}_{\text{mean}}=0.49 \text{ g.L}^{-1}.\text{d}^{-1}$).

%CO₂ effect: Comparing the experiments carried out with 30 °C, 98 $\mu\text{mol.m}^{-2}.\text{s}^{-1}$, air, 15 and 40% CO_2 , better results occurred with air ($X_{\text{max}}/X_0=14.93$; $\mu_{\text{max}}=0.96 \text{ d}^{-1}$; $P_{\text{max}}=0.58\text{g.L}^{-1}.\text{d}^{-1}$; $\text{CB}_{\text{max}}=1.06 \text{ g.L}^{-1}.\text{d}^{-1}$;) or 15% of CO_2 ($P_{\text{mean}}=0.27 \text{ g.L}^{-1}.\text{d}^{-1}$; $\text{CB}_{\text{mean}}=0.49 \text{ g.L}^{-1}.\text{d}^{-1}$). This can be explained because high concentrations of dissolved CO_2 can inhibit metabolic reactions associated with the Krebs cycle, leading to reduction/inhibition of cell growth (ONG *et al.*, 2010).

A statistical analysis was performed in a Statistic 7.0 to determine the variable effects, errors and significance of each coefficient. The results of variable effects and *p*-value are shown in **Table 4.4**. The decision about significance was based on the parameter value (*p*-value). If the parameter value was less than 0.05, the results were considered significant at level $\alpha=0.05$. For the dependent variables, μ_{max} , P_{max} , and CB_{max} , some effects have no value statistically significant at 5% ($p < 0.05$). In this sense, to μ_{max} was ignored the interaction effects ($X_1.X_2$, $X_1.X_3$, and $X_2.X_3$), to P_{max} and CB_{max} was ignored the interaction effect ($X_1.X_3$). New statistical analysis was performed generating a new table of effects, errors, coefficients, and others. The ANOVA results are presented in **Table 4.5**.

To evaluate the significance of regression was used the ratio between the mean square of regression and the mean square of residuals, and compared using the *F* test. For this, were analyzed the degrees of freedom associated to regression and to residual variances (BEZERRA *et al.*, 2008). In all cases, the results were higher than the tabulated value for *F*, indicating that the mathematical models were well fitted to the experimental data. The coefficient of determination R^2 , represents the quality of the quadratic fit. More than 93% of the experimental results can be explained by independent variables evaluated, with exception of lag duration phase when only 80% can be explained.

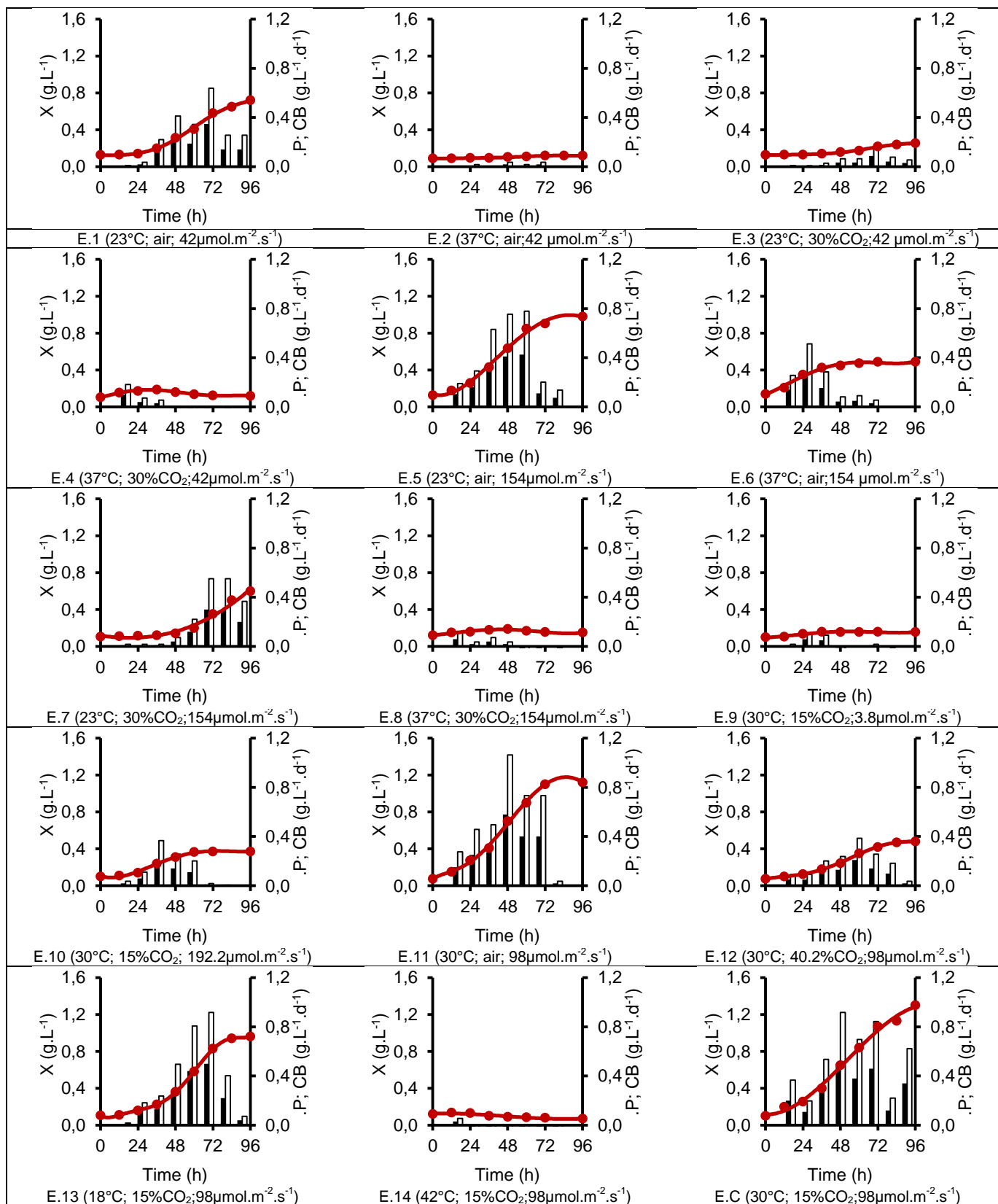


Figure 4.1: Cell concentration, biomass productivity and CO₂ incorporation rate profiles of *C. vulgaris* cultured at different T, LI and %CO₂ (● X_{obs} ; - X_{pred} ; ■ P; ▨ CB).

Table 4.4: Statistical analysis of CCRD results: effects estimates and p-values for X_{\max}/X_0 ; μ_{\max} ; λ ; P_{\max} ; P_{mean} ; CB_{\max} ; and CB_{mean} .

Source	X_{\max}/X_0		μ_{\max}		λ		P_{\max}		P_{mean}		CB_{\max}		CB_{mean}	
	Effect	p-Value	Effect	p-Value	Effect	p-Value	Effect	p-Value	Effect	p-Value	Effect	p-Value	Effect	p-Value
b_0	13.86	0.00	0.88	0.0001	0.49	0.0005	0.48	0.0005	0.26	0.0004	0.88	0.0002	0.46	0.0006
b_1	1.59	0.03	0.16	0.0044	0.11	0.0111	0.10	0.0151	0.04	0.0191	0.17	0.0046	0.08	0.0226
b_2	-8.80	0.00	-0.25	0.0017	0.19	0.0036	-0.28	0.0017	-0.17	0.0011	-0.52	0.0005	-0.30	0.0015
b_3	-7.19	0.00	-0.34	0.0021	0.38	0.0022	-0.32	0.0031	-0.18	0.0024	-0.58	0.0009	-0.32	0.0030
b_4	-8.88	0.01	-0.21	0.0128	0.52	0.0025	-0.24	0.0114	-0.18	0.0050	-0.45	0.0034	-0.31	0.0073
b_5	-3.49	0.01	-0.51	0.0004	-0.58	0.0004	-0.20	0.0036	-0.09	0.0042	-0.36	0.0011	-0.17	0.0050
b_6	-7.02	0.00	-0.36	0.0009	0.01	0.3393	-0.19	0.0038	-0.13	0.0019	-0.34	0.0011	-0.23	0.0025
b_7	-0.23	0.68	-0.27	0.0041	1.01	0.0004	-0.06	0.1007	-0.02	0.1434	-0.10	0.0334	-0.04	0.1642
b_8	-0.95	0.12	0.10	0.0153	-0.50	0.0008	-0.02	0.3388	-0.02	0.1318	-0.03	0.1497	-0.03	0.1514
b_9	1.39	0.10	-0.25	0.0047	-0.67	0.0008	0.08	0.0492	0.04	0.0561	0.15	0.0154	0.07	0.0657

Table 4.5: Analysis of variance (ANOVA) according to a CCCR.

Response	Source	Sum of square	df	Mean square	F-value	F-Critic	R ²
X_{\max}/X_0	Regression	395.78	6	65.963	39.813	3.217	0.96
	Residual error	16.57	10	1.657			
	Total	412.35	16				
μ_{\max}	Regression	1.59	9	0.177	12.944	3.677	0.94
	Residual error	0.10	7	0.014			
	Total	1.69	16				
λ	Regression	3.10	8	0.387	4.017	3.438	0.80
	Residual error	0.77	8	0.096			
	Total	3.87	16				
P_{\max}	Regression	0.57	7	0.082	16.145	3.293	0.93
	Residual error	0.05	9	0.005			
	Total	0.62	16				
P_{mean}	Regression	0.18	6	0.030	57.414	3.217	0.97
	Residual error	0.01	10	0.001			
	Total	0.19	16				
CB_{\max}	Regression	1.94	8	0.242	13.828	3.438	0.93
	Residual error	0.14	8	0.017			
	Total	2.08	16				
CB_{mean}	Regression	0.56	6	0.094	52.499	3.217	0.97
	Residual error	0.02	10	0.002			
	Total	0.58	16				

^aSignificância estatística ($\alpha=0.05$)

The model response functions (Y) were X_{\max} , μ_{\max} , P_{\max} , P_{mean} , CB_{\max} , and CB_{mean} and were related with X_1 , X_2 , and X_3 by a second order polynomial (Equation 4.5). The coefficients were directly applied to the model equation generating the response functions detailed in **Table 4.6** (Equations 4.7 to 4.12).

$$Y = b_0 + b_1X_1 + b_2X_1^2 + b_3X_2 + b_4X_2^2 + b_5X_3 + b_6X_3^2 + b_7X_1X_2 + b_8X_1X_3 + b_9X_2X_3 \quad (4.5)$$

Where b_0 , b_1 , b_2 , b_3 , b_4 , b_5 , b_6 , b_7 , b_8 , b_9 are coefficients of the model.

Table 4.6: Model equations for X_{\max}/X_0 ; μ_{\max} ; λ ; P_{\max} ; P_{mean} ; CB_{\max} ; and CB_{mean} .

Parameter	Model function	Eq.
X_{\max}	$= 13.86 + 0.82X_1 - 4.40X_1^2 - 3.59X_2 - 4.44X_2^2 - 1.92X_3 - 3.51X_3^2$	(4.6)
μ_{\max}	$= 0.88 + 0.08X_1 - 0.13X_1^2 - 0.17X_2 - 0.10X_2^2 - 0.26X_3 - 0.18X_3^2$ $- 0.13X_1X_2 + 0.05X_1X_3 - 0.12X_2X_3$	(4.7)
λ	$= 0.49 + 0.06X_1 + 0.10X_1^2 + 0.19X_2 + 0.26X_2^2 - 0.29X_3 + 0.01X_3^2$ $+ 0.50X_1X_2 - 0.25X_1X_3 - 0.34X_2X_3$	(4.8)
P_{\max}	$= 0.48 + 0.05X_1 - 0.14X_1^2 - 0.16X_2 - 0.12X_2^2 - 0.10X_3 - 0.09X_3^2$ $+ 0.04X_3$	(4.9)
P_{mean}	$= 0.26 + 0.02X_1 - 0.09X_1^2 - 0.09X_2 - 0.09X_2^2 - 0.05X_3 - 0.07X_3^2$	(4.10)
CB_{\max}	$= 0.88 + 0.09X_1 - 0.26X_1^2 - 0.29X_2 - 0.22X_2^2 - 0.18X_3 - 0.17X_3^2$ $- 0.05X_1X_2 + 0.08X_2X_3$	(4.11)
CB_{mean}	$= 0.46 + 0.04X_1 - 0.15X_1^2 - 0.16X_2 - 0.15X_2^2 - 0.09X_3 - 0.12X_3^2$	(4.12)

To find the optimal conditions, for a single response, two ways can be used: i) visual inspection of the surface response designs and ii) to find the critical point coordinates through the first derivate of the mathematical functions (Equations 4.6 to 4.12) as demonstrated below (Equations 4.13). In this sense, the surface responses are shown in **Figure 4.2** and the calculated critical points (maximum point) are shown in **Table 7**.

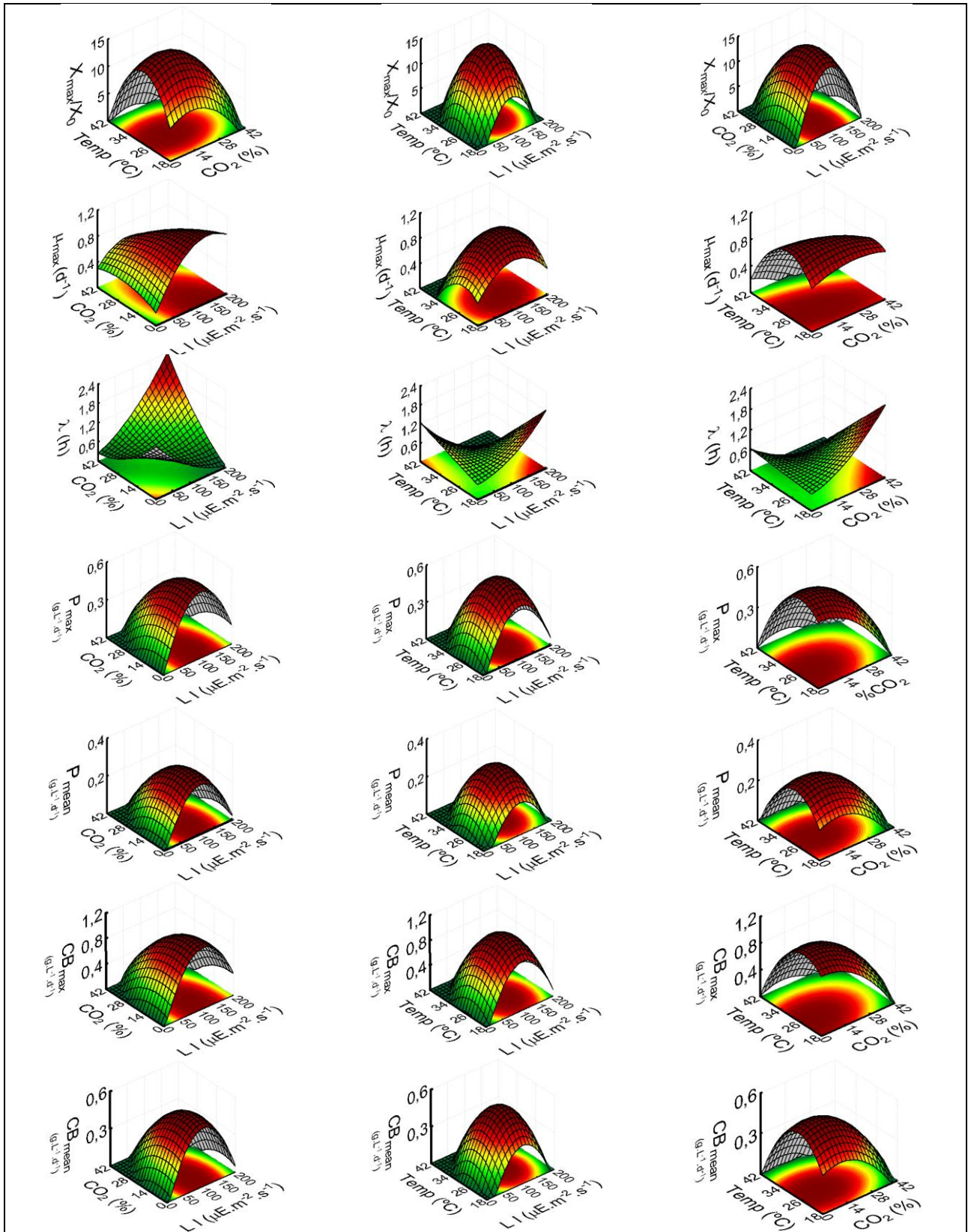


Figure 4.2: Surface response of *C. vulgaris* growth parameters (X_{max}/X_0 ; μ_{max} ; λ ; P_{max} ; P_{mean}) and CO₂ incorporation rate (CB_{max} ; CB_{mean}) as function of LI, T and %CO₂.

$$\begin{cases} \frac{\partial Y}{\partial X_1} = b_1 + 2b_2X_1 + b_7X_2 + b_8X_3 \\ \frac{\partial Y}{\partial X_2} = b_3 + 2b_4X_2 + b_7X_1 + b_9X_3 \\ \frac{\partial Y}{\partial X_3} = b_5 + 2b_6X_3 + b_8X_1 + b_9X_2 \end{cases} \quad (4.13)$$

Table 4.7: Estimation of critical values of the X_{\max}/X_0 ; μ_{\max} ; λ ; P_{\max} ; P_{mean} ; CB_{\max} ; and CB_{mean} .

Independent Variable	Responses						
	X_{\max}/X_0	μ_{\max}	λ	P_{\max}	P_{mean}	CB_{\max}	CB_{mean}
Light Intensity ($\mu\text{mol.m}^{-2}.\text{s}^{-1}$)	103	162	59	109	106	112	106
CO₂ (%)	12.0	-11.3	12.1	4.7	10.3	4.1	9.6
Temp (°C)	28.1	30.0	22.3	25.1	27.4	25.1	27.2

Conflicting responses were obtained in analysis of dependent variables; however these responses must be optimized simultaneously. In this sense, a multi-criteria method was necessary to optimize the culture conditions that promote simultaneously maximization of biomass growth and CO₂ mitigation.

Transform the original multi-response optimization into an ordinary single response optimization was used as multi-criteria method. This was carried out by first transforming the response values into desirabilities in the interval [0, 1]. The value 0 corresponds to an unacceptable value, and the value 1 corresponds to most acceptable value to the response (TAAVITSAINEN *et al.*, 2010). The next step was combining the individual desirabilities into an overall desirability, by calculating a weighted geometric mean of the individual desirabilities. The logic behind using a geometric mean is that, if any of the individual desirabilities is 0, so is the overall desirability. Also, if all individual desirabilities are 1, so is the overall desirability (TAAVITSAINEN *et al.*, 2010).

The D_f approach (Equations 14 and 15) was used in the following analyzes. In this sense, to maximize this function was used the relations expressed in Equations 6 to 12 with the coefficients expressed in **Table 4.8**. The factor levels and predicted responses of the desirability function are shown in **Table 4.9** and **Figure 4.3**.

$$D_j = \left(\prod_{i=1}^n d_{i,j} \right)^{1/n} \quad (4.14)$$

$$d_j = \begin{cases} 0 & \text{if } y < Low_{value} \\ \left(\frac{y - Low_{value}}{High_{value} - Low_{value}} \right)^s & \text{if } Low_{value} \leq y \leq High_{value} \\ 1 & \text{if } y > High_{value} \end{cases} \quad (4.15)$$

Table 4.8: Parameters used in Desirability approach.

Variable	Low value	Desirability	Medium value	Desirability	High value	Desirability
X_{max}/X₀	1.13	0.00	8.03	0.50	14.93	1.00
μ_{max}	0.01	0.00	0.49	0.50	0.96	1.00
λ	0.00	1.00	1.00	0.50	2.00	0.00
P_{max}	0.02	0.00	0.30	0.50	0.58	1.00
P_{mean}	0.00	0.00	0.15	0.50	0.29	1.00
CB_{max}	0.04	0.00	0.55	0.50	1.06	1.00
CB_{mean}	0.00	0.00	0.25	0.50	0.51	1.00

With the analysis of **Table 4.9** and **Figure 4.3**, for a $D \geq 0.96$ the optimized conditions were 108-117 $\mu\text{mol.m}^{-2}.\text{s}^{-1}$, 26.5-27.6 °C and 6.03-8.05% of CO₂. Assays for validation of the model were carried out with the established operating conditions (108 $\mu\text{mol.m}^{-2}.\text{s}^{-1}$, 26.5 °C and 8.05% of CO₂), which were selected to minimize the cost of light source, temperature maintenance and maximize the utilization of carbon dioxide. However, is important to say that, the weight of parameters, in the method of desirability, can be changed as the need to prioritize one or more individual responses and the results obtained will differ of these.

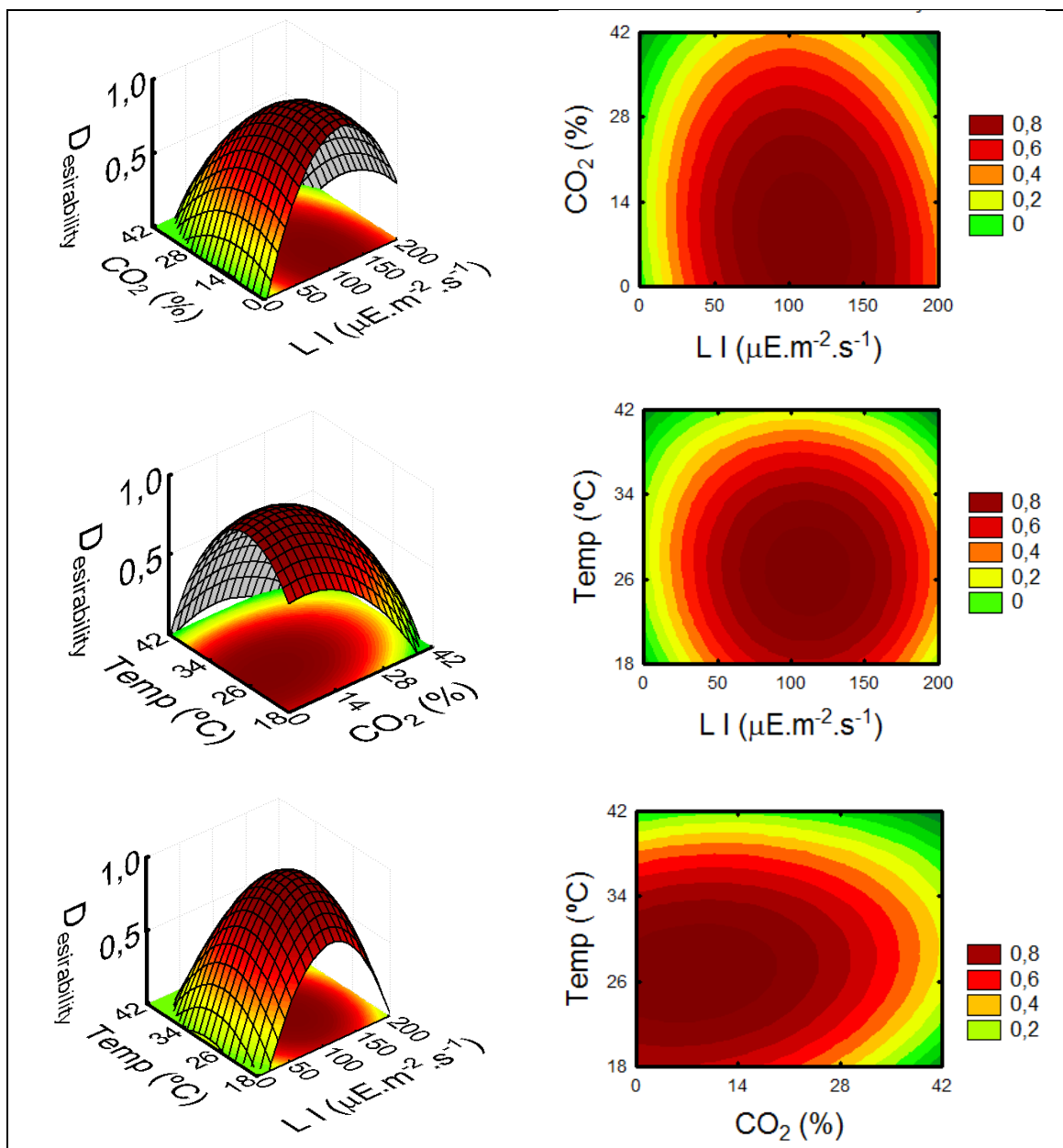


Figure 4.3: Surface response of desirability function to optimize simultaneously growth parameters (X_{\max}/X_0 ; μ_{\max} ; λ ; P_{\max} ; P_{mean}) and CO_2 incorporation rate (CB_{\max} ; CB_{mean}) as function of LI, T and % CO_2 .

The experimental validation of the model was performed in triplicate and the results are shown in **Figure 4.4**. In **Table 4.10** is presented a comparison of model predicted results and observed results of validation experiment. Biomass samples of these

experiments were also evaluated in terms of lipid content when was obtained about 50% of lipid.

Table 4.9: Factor levels and predicted responses of the Desirability function to optimize simultaneously growth parameters (X_{\max}/X_0 ; μ_{\max} ; λ ; P_{\max} ; P_{mean}) and CO_2 incorporation rate (CB_{\max} ; CB_{mean}) as function of LI, T and $\%\text{CO}_2$.

Level	Factor level	Predicted responses							
		X_{\max}/X_0 (g.L ⁻¹)	μ_{\max} (d ⁻¹)	λ (d)	P_{\max} (g.L ⁻¹ .d ⁻¹)	P_{mean} (g.L ⁻¹ .d ⁻¹)	CB_{\max} (g.L ⁻¹ .d ⁻¹)	CB_{mean} (g.L ⁻¹ .d ⁻¹)	D.
Light Intensity ($\mu\text{mol.m}^{-2}.\text{s}^{-1}$)	79.16	13.74	0.94	0.57	0.53	0.28	0.98	0.49	0.90
	88.58	14.30	0.97	0.54	0.56	0.29	1.02	0.51	0.94
	98.00	14.61	1.00	0.52	0.57	0.30	1.05	0.52	0.95
	107.42	14.67	1.01	0.50	0.58	0.30	1.06	0.53	0.96
	116.84	14.48	1.03	0.49	0.58	0.30	1.06	0.53	0.96
	126.26	14.05	1.03	0.48	0.57	0.29	1.05	0.52	0.95
	135.68	13.36	1.03	0.48	0.55	0.28	1.02	0.50	0.92
%CO ₂	0.00	13.41	1.00	0.49	0.57	0.28	1.05	0.50	0.94
	2.01	13.86	1.01	0.49	0.58	0.29	1.06	0.52	0.95
	4.02	14.22	1.01	0.49	0.58	0.29	1.07	0.52	0.95
	6.03	14.49	1.01	0.49	0.58	0.30	1.07	0.53	0.96
	8.04	14.67	1.01	0.50	0.58	0.30	1.06	0.53	0.96
	10.05	14.76	1.01	0.52	0.57	0.30	1.05	0.53	0.95
	12.06	14.77	1.01	0.54	0.57	0.30	1.04	0.52	0.95
	14.07	14.68	1.00	0.56	0.56	0.29	1.02	0.52	0.94
	16.08	14.51	0.99	0.60	0.55	0.29	1.00	0.51	0.93
	18.09	14.24	0.98	0.63	0.53	0.28	0.97	0.49	0.91
Temperature (°C)	22.92	13.11	0.96	0.58	0.57	0.28	1.05	0.50	0.92
	24.10	13.83	0.99	0.55	0.58	0.29	1.06	0.51	0.94
	25.28	14.35	1.01	0.53	0.58	0.30	1.07	0.53	0.95
	26.46	14.67	1.01	0.50	0.58	0.30	1.06	0.53	0.96
	27.64	14.79	1.01	0.48	0.57	0.30	1.05	0.53	0.96
	28.82	14.71	1.00	0.46	0.56	0.29	1.02	0.52	0.95
	30.00	14.44	0.97	0.43	0.54	0.29	0.99	0.51	0.94
	31.18	13.96	0.94	0.41	0.52	0.27	0.95	0.48	0.91

Table 4.10: Results of experimental model validation compared with model prediction data.

	X_{\max}/X_0 (g.L ⁻¹)	μ_{\max} (d ⁻¹)	λ (d)	P_{\max} (g.L ⁻¹ .d ⁻¹)	P_{mean} (g.L ⁻¹ .d ⁻¹)	CB_{\max} (g.L ⁻¹ .d ⁻¹)	CB_{mean} (g.L ⁻¹ .d ⁻¹)
Predict	14.67 ± 0.06	1.01 ± 0.04	0.50 ± 0.05	0.58 ± 0.04	0.30 ± 0.02	1.06 ± 0.04	0.53 ± 0.04
Observed	14.78 ± 0.31	1.02 ± 0.01	0.50 ± 0.00	0.58 ± 0.02	0.31 ± 0.01	1.06 ± 0.02	0.55 ± 0.01

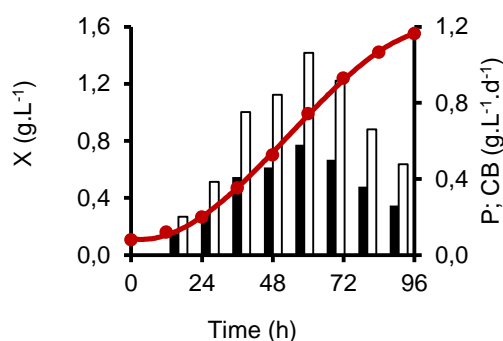


Figure 4.4: Cell concentration, biomass productivity and CO₂ incorporation rate profiles of *C. vulgaris* cultured at 26.5°C, 108 $\mu\text{mol.m}^{-2}.\text{s}^{-1}$, and 8.05 %CO₂ ('●' X_{obs} ; '---' X_{pred} ; '▒' P; '▒' CB).

In 2013, the effect of CO₂ concentration (2-10%) and aeration rate (0.1-0.7 VVM) on *C. vulgaris* (P12) carbon dioxide mitigation was evaluated using a 2² factorial central composite design with the following results: $X_{\text{max}}=9.97 \text{ g.L}^{-1}$, $P_{\text{max}}= 1.33 \text{ g.L}^{-1}.\text{d}^{-1}$, $\text{CB}_{\text{max}}=2.22 \text{ g.L}^{-1}.\text{d}^{-1}$, and 11% of lipid when cultured with 30 °C, 70 $\mu\text{mol.m}^{-2}.\text{s}^{-1}$, 1.1 $\text{g}(\text{NH}_2)_2\text{CO}.\text{L}^{-1}$, 2.10^7 cell/mL , 6.5% CO₂, 0.5 vvm, and 7 days of cultivation in a photobioreactor with 90 mL of working volume (ANJOS *et al.*, 2013).

In 2012, the individual effect of media (Basal, modified Bristol's, MBL medium) and cultivation conditions (phototrophic, heterotrophic, photoheterotrophic, mixotrophic) was evaluated using *C. vulgaris* (ESP31). Results were $X_{\text{max}}=4.5 \text{ g.L}^{-1}$, and 22% of lipid when cultured with 25 °C, 60 $\mu\text{mol.m}^{-2}.\text{s}^{-1}$, 1.25 $\text{gNaNO}_3.\text{L}^{-1}$, 0.02 $\text{g}_{\text{cell}}.\text{L}^{-1}$, 2% CO₂, 0.2 vvm, and 20 days of cultivation in a photobioreactor with 1 L of working volume (YEH e CHANG, 2012).

In 2011, individual effect of CO₂ (0.03-15%), NO₃ (0.01-10 g.L^{-1}), and PO₄ (0-0.1 g.L^{-1}) concentration was evaluated in a *C. vulgaris* strain isolated in South Africa. Results were $X_{\text{max}}= 1.22 \text{ g.L}^{-1}$ and 21% of lipid when cultured with 25 °C, 150-350 $\mu\text{mol.m}^{-2}.\text{s}^{-1}$, 0.5 $\text{gNaNO}_3.\text{L}^{-1}$, 4% CO₂, and 15 days of cultivation in a photobioreactor with 0.1 L of working volume (BHOLA *et al.*, 2011).

In 2010, the individual effect of light source (fluorescent lamp and tungsten lamp), light intensity (90-370 $\mu\text{mol.m}^{-2}.\text{s}^{-1}$), and carbon source (NaHCO₃, Na₂CO₃) was evaluated on biomass growth of *C. vulgaris* (ESP31). Results were $X_{\text{max}}= 0.6 \text{ g.L}^{-1}$, and 20-39% of lipid when cultured with 25 °C, 80 $\mu\text{mol.m}^{-2}.\text{s}^{-1}$ (Fluorescent lamp (TL5)), 1.25

$\text{g}_{\text{KNO}_3} \cdot \text{L}^{-1}$, $0.02 \text{ g}_{\text{cell}} \cdot \text{L}^{-1}$, $1.2 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$ of NaHCO_3 , and 7 days of cultivation in a photobioreactor with 1 L of working volume (YEH *et al.*, 2010).

These values are complete different when compared with the obtained in this work: $X_{\text{max}}=1.6 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$, $P_{\text{max}}= 0.58 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1} \cdot \text{d}^{-1}$, $\text{CB}_{\text{max}}= 1.06 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1} \cdot \text{d}^{-1}$, and 50% of lipid when cultured with $26.5 \text{ }^\circ\text{C}$, $108 \text{ } \mu\text{mol} \cdot \text{m}^{-2} \cdot \text{s}^{-1}$, $0.25 \text{ g}_{\text{NaNO}_3} \cdot \text{L}^{-1}$, $0.1 \text{ g}_{\text{cell}} \cdot \text{L}^{-1}$, 8.05% CO_2 , 1 vvm, and 4 days of cultivation in a photobioreactor with 3 L of working volume. However, it can be explained by the use of different conditions used as light intensity, temperature, microalgae strain, nitrogen source, nitrogen availability, initial cell concentration, and culture medium. As showed above, it is difficult to compare our results with literature because of the innumerable differences in culture conditions.

4. Conclusions

Biomass growth and carbon dioxide mitigation by *Chlorella vulgaris* were simultaneously optimized using a central composite rotatable design (CCRD), a response surface methodology (RSM) and a multi-criteria function as desirability (D_f). The impact of light intensity, nutrient availability and temperature on biomass ratio (final/initial), maximum specific growth rate, duration of lag phase, maximum and mean productivity, maximum and mean carbon dioxide incorporation rate were also evaluated. The analytical method proved suitable for the treatment of results, as it provided an optimal condition for cultivation of microalgae.

The conditions that can maximize biomass growth and carbon dioxide incorporation rate and minimize the lag phase duration are $108 \text{ } \mu\text{mol} \cdot \text{m}^{-2} \cdot \text{s}^{-1}$, $26.5 \text{ }^\circ\text{C}$ and 8.05% of CO_2 . With the experimental validation of the proposed conditions was possible to obtain: $X_{\text{max}}/X_0=14.78$; $\mu_{\text{max}}=1.02 \text{ d}^{-1}$; $\lambda=0.50 \text{ d}$; $P_{\text{max}}=0.58 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1} \cdot \text{d}^{-1}$; $P_{\text{mean}}=0.31 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1} \cdot \text{d}^{-1}$; $\text{CB}_{\text{max}}=1.06 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1} \cdot \text{d}^{-1}$; $\text{CB}_{\text{mean}}=0.55 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1} \cdot \text{d}^{-1}$. Is important to say that, if the weight of parameters, in the method of desirability, can be changed as the need to prioritize one or more individual responses and the results obtained will differ of these.

5. Acknowledgement

Funding for this research was provided by the Fundação de Amparo a Pesquisa no Estado de São Paulo, FAPESP (Brazil); Capes; CNPQ and PETROBRAS.

6. References

ACIÉN FERNÁNDEZ, F. G.; FERNÁNDEZ SEVILLA, J. M.; SÁNCHEZ PÉREZ, J. A.; MOLINA GRIMA, E.; CHISTI, Y. Airlift-driven external-loop tubular photobioreactors for outdoor production of microalgae: assessment of design and performance. **Chemical Engineering Science**, v. 56, n. 8, p. 2721-2732, 2001.

ALYABYEV, A. J.; LOSEVA, N. L.; GORDON, L. K.; ANDREYEVA, I. N.; RACHIMOVA, G. G.; TRIBUNSKIY, V. I.; PONOMAREVA, A. A.; KEMP, R. B. The effect of changes in salinity on the energy yielding processes of *Chlorella vulgaris* and *Dunaliella maritima* cells. **Thermochimica Acta**, v. 458, n. 1-2, p. 65-70, 2007.

ANJOS, M.; FERNANDES, B. D.; VICENTE, A. A.; TEIXEIRA, J. A.; DRAGONE, G. Optimization of CO₂ bio-mitigation by *Chlorella vulgaris*. **Bioresource Technology**, v. 139, n. 0, p. 149-154, 2013.

BARROS NETO, B.; SCARMINIO, I. S.; BRUNS, R. E. **Como fazer experimentos: pesquisa e desenvolvimento na ciência e na indústria**. 2. Campinas: Editora Unicamp, 2003.

BARSANTI, L.; GUALTIERI, P. **Algae – Anatomy, Biochemistry And Biotechnology**. Taylor & Francis Group, 2006.

BERTOLDI, F. C.; SANT'ANNA, E.; OLIVEIRA, J. L. B. Revisão: Biotecnologia de microalgas. **CEPPA**, v. 26, p. 9-20, 2008.

BEZERRA, M. A.; SANTELLI, R. E.; OLIVEIRA, E. P.; VILLAR, L. S.; ESCALEIRA, L. A. Review: Response surface methodology (RSM) as a tool for optimization in analytical chemistry. **Talanta**, v. 76, n. 5, p. 965-977, 2008.

BHOLA, V.; DESIKAN, R.; SANTOSH, S. K.; SUBBURAMU, K.; SANNIYASI, E.; BUX, F. Effects of parameters affecting biomass yield and thermal behaviour of *Chlorella vulgaris*. **Journal of Bioscience and Bioengineering**, v. 111, n. 3, p. 377-382, 2011.

DERNER, R. B.; OHSE, S.; VILELLA, M.; CARVALHO, S. M.; FETT, R. Microalgas, produtos e aplicações. **Ciência Rural**, v. 36, n. 6, p. 1959-1967, 2006.

FAN, L.-H.; ZHANG, Y.-T.; ZHANG, L.; CHEN, H.-L. Evaluation of a membrane-sparged helical tubular photobioreactor for carbon dioxide biofixation by *Chlorella vulgaris*. **Journal of Membrane Science**, v. 325, n. 1, p. 336-345, 2008.

FLORIDES, G. A.; CHRISTODOULIDES, P. Global warming and carbon dioxide through sciences. **Environ Int**, v. 35, n. 2, p. 390-401, 2009.

HIRATA, S.; HAYASHITANI, M.; TAYA, M.; TONE, S. Carbon dioxide fixation in batch culture of *Chlorella* sp. using a photobioreactor with a sunlight-collection device. **Journal of Fermentation and Bioengineering**, v. 81, n. 5, p. 470-472, 1996.

JACOB-LOPES, E.; LACERDA, L. M. C. F.; FRANCO, T. T. Biomass production and carbon dioxide fixation by *Aphanothece microscopica Nägeli* in a bubble column photobioreactor. **Biochemical Engineering Journal**, v. 40, n. 1, p. 27-34, 2008.

KAJIWARA, S.; YAMADA, H.; OHKUNI, N.; OHTAGUCHI, K. Design of the bioreactor for carbon dioxide fixation by *Synechococcus* PCC7942. **Energy Conversion and Management**, v. 38, Supplement, n. 0, p. S529-S532, 1997.

KONG, Q.; ZHU, L.; SHEN, X. The toxicity of naphthalene to marine *Chlorella vulgaris* under different nutrient conditions. **J Hazard Mater**, v. 178, n. 1-3, p. 282-6, 2010.

KOOCHEKI, A.; TAHERIAN, A. R.; RAZAVI, S. M. A.; BOSTAN, A. Response surface methodology for optimization of extraction yield, viscosity, hue and emulsion stability of mucilage extracted from *Lepidium perfoliatum* seeds. **Food Hydrocolloids**, v. 23, p. 2369–2379, 2009.

KUMAR, K.; DASGUPTA, C. N.; NAYAK, B.; LINDBLAD, P.; DAS, D. Development of suitable photobioreactors for CO₂ sequestration addressing global warming using green algae and cyanobacteria. **Bioresour Technology**, v. 102, n. 8, p. 4945-4953, 2011.

LACERDA, L. M. C. F.; QUEIROZ, M. I.; FURLAN, L. T.; LAURO, M. J.; MODENESI, K.; JACOB-LOPES, E.; FRANCO, T. T. Improving refinery wastewater for microalgal biomass production and CO₂ biofixation: Predictive modeling and simulation. **J Petrol Sci Eng**, v. 78, n. 3-4, p. 679-686, 2011.

LLOYD, N. D. H.; CANVIN, D. T.; CULVER, D. A. Photosynthesis and Photorespiration in Algae. **Plant Physiol.**, v. 59, p. 936-940, 1977.

MCEVOY, E.; WRIGHT, P. C.; BUSTARD, M. T. The effect of high concentration isopropanol on the growth of a solvent-tolerant strain of *Chlorella vulgaris*. **Enzyme and Microbial Technology**, v. 35, n. 2-3, p. 140-146, 2004.

ONG, S. C.; KAO, C. Y.; CHIU, S. Y.; TSAI, M. T.; LIN, C. S. Characterization of the thermal-tolerant mutants of *Chlorella* sp. with high growth rate and application in outdoor photobioreactor cultivation. **Bioresour Technol**, v. 101, n. 8, p. 2880-3, 2010.

PINZI, S.; LOPEZ-GIMENEZ, F. J.; RUIZ, J. J.; DORADO, M. P. Response surface modeling to predict biodiesel yield in a multi-feedstock biodiesel production plant. **Bioresour Technol**, v. 101, n. 24, p. 9587-93, 2010.

POWELL, E. E.; MAPIOUR, M. L.; EVITTS, R. W.; HILL, G. A. Growth kinetics of *Chlorella vulgaris* and its use as a cathodic half cell. **Bioresour Technol**, v. 100, n. 1, p. 269-74, 2009.

PULZ, O.; GROSS, W. Valuable products from biotechnology of microalgae. **Appl Microbiol Biotechnol**, v. 65, n. 6, p. 635-48, 2004.

RADMER, R. J. Algal diversity and commercial algal products. **American Institute of Biological Sciences**, v. 46, p. 263-270, 1996.

RAMANAN, R.; KANNAN, K.; DESHKAR, A.; YADAV, R.; CHAKRABARTI, T. Enhanced algal CO₂ sequestration through calcite deposition by *Chlorella* sp. and *Spirulina platensis* in a mini-raceway pond. **Bioresour Technol**, v. 101, n. 8, p. 2616-22, 2010.

RICHMOND, A. **Handbook of microalgal culture : biotechnology and applied phycology**. Blackwell Science Ltd, 2004.

ROBARTS, R. D.; ZOHARY, T. Temperature effects on photosynthetic capacity, respiration, and growth rates of bloom-forming cyanobacteria. . **New Zealand Journal of Marine and Freshwater Research**, v. 21, p. 391-399, 1987.

RODOLFI, L.; CHINI ZITTELLI, G.; BASSI, N.; PADOVANI, G.; BIONDI, N.; BONINI, G.; TREDICI, M. R. Microalgae for oil: strain selection, induction of lipid synthesis and outdoor mass cultivation in a low-cost photobioreactor. **Biotechnol Bioeng**, v. 102, n. 1, p. 100-12, 2009.

RODRIGUES, M. I.; IEMMA, A. F. **Planejamento de experimentos e otimização de processos**. 2. Campians: Casa do espírito amigo fraternidade fé e amor, 2009.

SHARMA, R.; SINGH, G. P.; SHARMA, V. K. Comparison of different media formulations onf growth, morphology and chlorlphyll content of green alga, *Chlorella vulgaris*. **International Journal of Pharma and Bio Sciences**, v. 2, n. 2, 2011.

STEIN, J. R. **Handbook of phycological methods. Culture methods and growth measurements**. London: Cambridge University Press, 1973. 1-448

TAAVITSAINEN, V. M.; LEHTOVAARA, A.; LÄHTEENMÄKI, M. Response surfaces, desirabilities and rational functions in optimizing sugar production. **Journal of Chemometrics**, v. 24, n. 7-8, p. 505-513, 2010.

TABERNERO, A.; MARTÍN DEL VALLE, E. M.; GALÁN, M. A. Evaluating the industrial potential of biodiesel from a microalgae heterotrophic culture: Scale-up and economics. **Biochemical Engineering Journal**, v. 63, p. 104-115, 2012.

WANG, S. J.; ZHONG, J. J. **Chapter 6 - Bioreactor engineering**. In: YANG, S.-T. (Ed.). *Bioprocessing for Value-Added Products from Renewable Resources*. China, 2007.

YANG, H.; XU, Z.; FAN, M.; GUPTA, R.; SLIMANE, R.; BLAND, A.; WRIGHT, I. Progress in carbon dioxide separation and capture: A review. **Journal of Environmental Sciences**, v. 20, n. 1, p. 14-27, 2008.

YEH, K.-L.; CHANG, J.-S. Effects of cultivation conditions and media composition on cell growth and lipid productivity of indigenous microalga *Chlorella vulgaris* ESP-31. **Bioresource Technology**, v. 105, n. 0, p. 120-127, 2012.

YEH, K.-L.; CHANG, J.-S.; CHEN, W.-M. Effect of light supply and carbon source on cell growth and cellular composition of a newly isolated microalga *Chlorella vulgaris* ESP-31. **Engineering in Life Sciences**, v. 10, n. 3, p. 201-208, 2010.

ZWIETERING, M. H.; JONGENBURGER, I.; ROMBOUTS, F. M.; VAN 'T RIET, K. Modeling of the bacterial growth curve. **Appl Environ Microbiol**, v. 56, n. 6, p. 1875-81, 1990.

CAPÍTULO 5

NITROGEN LIMITATION IMPROVES FATTY ACID PROFILE FOR BIODIESEL PRODUCTION: PREDICTION OF QUALITY PROPERTIES

*SUBMETIDO EM 2013 À EDIÇÃO ESPECIAL DO ALGAL RESEARCH
JOURNAL - ELSEVIER*

Nitrogen limitation improves fatty acid profile for biodiesel production: Prediction of quality properties

Lucy Mara Cacia Ferreira Lacerda, Mônica Regina Piovani, and Telma Teixeira Franco*

* School of Chemical Engineering, State University of Campinas, UNICAMP, Brazil.

Highlights

1. Effect of nitrogen limitation on biomass growth and lipid accumulation;
2. Effect of nitrogen on lipid profile and biodiesel quality;
3. Nitrogen limitation increase C18:1, C16:0, and C18:0 contents.
4. Use of models to predict biodiesel quality parameters as a function of FA profiles.
5. An alternative way to reduce cost and time with biodiesel quality analysis.

Abstract

The suitability of microalgae biodiesel can be affected by the fatty acid (FA) profile as a function of nutrient limitation. For this reason, we evaluated the effect of nitrogen limitation on biodiesel quality as a function of FA profile. The experiments were carried out with initial NaNO_3 concentrations of 0.25, 0.37, 0.50, 0.75, and 1.00 g.L^{-1} . Biodiesel quality was predicted based on the FA profiles analyzed and the results were compared with different international standards. The best values for biodiesel quality were $\text{CN} = 56$, $\text{CFPP} = 0.8^\circ\text{C}$, $\rho = 863 \text{ kg/m}^3$, $\text{II} = 97 \text{ g}_{\text{I}_2}/100\text{g}$, $\Delta\text{HC} = 39.2 \text{ kJ/g}$, $\text{OSI} = 13.8 \text{ h}$, and $\mu = 3.93 \text{ mm}^2.\text{s}$, obtained with an initial NaNO_3 concentration of 0.25 g.L^{-1} . A decrease in initial NaNO_3 concentration of 75% caused an increases of 173% and 30% in the C18:1 and C16:0, respectively. The results indicate the potential of *Chlorella vulgaris* as a raw material for biodiesel production.

Key words: nitrogen limitation; fatty acid profile; biodiesel quality; *Chlorella vulgaris*.

1. Introduction

Biodiesel is an attractive energy resource for several reasons: it is a renewable and environmentally friendly fuel, is highly biodegradable, has minimal toxicity, decreases dependence on foreign crude oil, and can be used in existing diesel engines with little or no modification, resulting in the release of only very small amounts of chemical substances that are harmful to the environment (AHMAD *et al.*, 2011). Thus, biodiesel is an alternative that can substantially replace conventional diesel; reduce exhaust pollution; and offer numerous energy security, economic, and environmental benefits (NIGAM e SINGH, 2011).

Feedstocks such as rapeseed, soybeans, palm oil, and sunflowers are considered to be first-generation biodiesel feedstocks. More than 95% of this type of biodiesel is made from edible oils and its use has generated many problems, mainly due to its impact on global food markets and food security. Non-food feedstocks have been developed to produce biodiesel and to reduce dependence on edible oil. Energy crops such as jatropha, mahua, jojoba oil, tobacco seed, salmon oil, and sea mango are some of these second-generation biodiesel feedstocks (AHMAD *et al.*, 2011).

Third-generation biodiesel is derived from microalgae (NIGAM e SINGH, 2011) and is referred to as advanced biodiesel. It is considered to be a viable alternative energy resource that is devoid of the major drawbacks associated with first- and second-generation biodiesel (NIGAM e SINGH, 2011).

Different species of microalgae can be found in all existing earth ecosystems under a wide range of environmental conditions (MATA *et al.*, 2010). Microalgae-based biodiesel can be produced by the transesterification of fatty acids (FAs) to fatty acid methyl esters (FAMES) using a monohydric alcohol and catalyst (KNOTHE, G., GERPEN, J.V., KRAHL, J., 2005; BUCY *et al.*, 2012).

The FA profile of microalgae can be mainly affected by nutrient limitation and nitrogen is the single most critical nutrient affecting lipid metabolism in algae, followed by phosphorous and sulfur (HU *et al.*, 2008). Several studies indicate that limiting nitrogen induces various physiological changes in microalgae, altering the composition and the

kinetics of intracellular growth, causing a progressive decrease in cell growth and increase in FA accumulation (PEREZ-GARCIA *et al.*, 2011). Cultivation parameters such as temperature and light intensity have been found to have a major effect on the FA profile of algae. The age of culture can change the FA profile and many algal species show an increase in TAGs during the stationary phase (HU *et al.*, 2008).

The suitability of microalgae biodiesel as fuel can be affected by contaminants arising from production and the characteristics of the individual FAMES, which are mainly determined by the structural features of the FA (KNOTHE, G., GERPEN, J.V., KRAHL, J., 2005; KNOTHE, G., 2005; KNOTHE, 2008; RAMOS *et al.*, 2009). Several studies have shown that the increase in chain length and decrease in unsaturation of FAMES improve the heating value, cetane number, and oxidation stability. However, the decrease in chain length and increase in unsaturation of FAMES improve the viscosity and low-temperature flow characteristics (KNOTHE *et al.*, 2003; LAPUERTA *et al.*, 2010). For this reason, it is intrinsically difficult to optimize all these parameters in the same FA profile (PINZI *et al.*, 2011).

Technical regulations for biodiesel include ASTM-D6751 in the USA, EN-14214/14213 in Europe, DIN-V51606 in Germany, ANP-255/2003 in Brazil, and other standards. These specifications establish limits for density, viscosity, heat of combustion, cetane number, oxidation stability index, iodine value, linolenic acid methyl ester content, and other important parameters to ensure high product quality, user confidence, and public health.

Determination of the cetane number and other biodiesel quality properties by an experimental procedure can be an expensive and time-consuming process (GOPINATH *et al.*, 2009). Accordingly, studies on the effect of FA profile on biodiesel quality are necessary to reduce costs and time of analysis (RAMOS *et al.*, 2009) and have been carried out by several research groups (ALLEN *et al.*, 1999; KNOTHE, G., GERPEN, J.V., KRAHL, J., 2005; GOPINATH *et al.*, 2009; PEREYRA-IRUJO *et al.*, 2009; RAMOS *et al.*, 2009; PRATAS *et al.*, 2011).

In this paper, the impact of nitrogen limitation on the microalgae FA profile, biomass growth, and lipid accumulation is determined. Various methods for the

prediction of different biodiesel properties as a function of FA profile are presented and standards were used to verify the quality and applicability of *C. vulgaris* as a raw material for biodiesel production.

2. Materials and Methods

2.1. Microalgae

Stock cultures of *Chlorella vulgaris* (CPCC 90) were propagated and maintained in synthetic BBM medium (STEIN, 1973) whose composition is shown in **Table 5.1**. The incubation conditions used were 25 °C, a photon flux density of 15 $\mu\text{mol.m}^{-2}.\text{s}^{-1}$, and constant aeration by bubbling.

Table 5.1: BBM synthetic medium composition (pH 6.8).

Parameter	Value (g.L ⁻¹)	Parameter	Value (g.L ⁻¹)
Na ₂ EDTA	0.050	Fe ₂ SO ₄ .7H ₂ O	0.00498
KOH	0.0031	H ₂ SO ₄ (μL/L)	1
CaCl ₂ .2H ₂ O	0.025	H ₃ BO ₃	0.01142
MgSO ₄ .7H ₂ O	0.075	ZnSO ₄ .7H ₂ O	0.00882
K ₂ HPO ₄	0.075	MnCl ₂ .4H ₂ O	0.00144
KH ₂ PO ₄	0.175	CuSO ₄ .5H ₂ O	0.00157
NaCl	0.025	Co(NO ₃) ₂ .6H ₂ O	0.00049
NaNO ₃	0.250	MoO ₃	0.00071

2.2. Culture system

The experiments were carried out in a bubble column photobioreactor. The system was made of 4 mm thick glass and had an internal diameter of 8.0 cm, a height of 80 cm, and a nominal working volume of 3.0 L. The dispersion system for the reactor consisted of a 1.5 cm diameter air diffuser located at the center of the column. The reactor was continuously illuminated with sixteen 40 W fluorescent daylight-type tubes (General Electric, Brazil), connected in parallel and located in a photoperiod chamber. Airflow into the photobioreactor was provided via a filtered air and pure CO₂ cylinder

(Praxair, Inc., Brazil) through Teflon tubing. The gas mixture was adjusted to achieve the desired concentration of carbon dioxide in the air stream through rotameters that measured the flow rates of the carbon dioxide and the air (JACOB-LOPES *et al.*, 2008).

2.3. Experimental conditions

The operational conditions of the photobioreactor were batch mode, fed with 3.0 L of BBM with initial NaNO_3 concentrations of 0.25, 0.37, 0.50, 0.75, and 1.00 g.L^{-1} . The experimental conditions were as follows: an initial cell concentration of 0.1 g.L^{-1} , an isothermal reactor operating at a temperature of 26 °C, a photon flux density of 108 $\mu\text{mol.m}^{-2}.\text{s}^{-1}$, and continuous aeration of 1 VVM with the injection of air containing 8.05% carbon dioxide. The cell concentration and pH were monitored every 12 h during the microbial growth phases. Residence times of up to 96h were adopted for the experiments. The tests were carried out in duplicate and the kinetic data refers to the mean of four repetitions.

The photon flux density was determined using a digital photometer (Spectronics, model XRP3000), measuring the incident light on the external reactor surface. The temperature was controlled using thermostats and measured using a polarographic probe (Mettler Toledo, InPro5000 series). The flow rates of the carbon dioxide and air were determined using rotameters (AFSG 100 Key Instruments).

2.4. Biomass and pH dynamics

Cell concentration was evaluated gravimetrically by filtering a known volume of culture medium through a 0.22 μm filter and drying at 60 °C for 24 hours. The pH dynamics during cultivation were measured by a potentiometer (Hanna, model 8417). Stationary phase cells were harvested by centrifugation at 8000g for 10 min (Hettich Model Rotina 420), frozen at -80 °C (So-Low Ultra freezer Model PV 85-13), and freeze-dried at -30 °C and 50 mHg (Liobras-Model L101) for lipid analysis.

2.5. *Lipid analysis*

The amount of lipid was determined using 400 mg of lyophilized biomass digested by 5 mL of HCl 2 mol.L⁻¹ at 80 °C during 1 h. The extraction process started with the centrifugation (500g for 2min) of the digested biomass. Then the supernatant was removed and the pellet mixed with 4 mL of methanol, 2 mL of chloroform, and 3.6 mL of distilled water, followed by agitation (2 min) and centrifugation (500 g for 2 min). The lower phase was transferred to a test tube. Re-extraction was carried out in upper phase by addition of 4 mL of a 10% v/v methanol:chloroform solution, followed by agitation and centrifugation (500 g for 2 min). The lower phase was added to the test tube and the chloroform removed at 75°C (BLIGH e DYER, 1959).

2.6. *Direct transesterification*

Direct transesterification was carried out using 20 mg of lyophilized biomass. Three mL of methanol:hydrochloric acid:chloroform mixture (10:1:1) was added to the sample, agitated, and left at 90 °C for 1 h. The samples were cooled to room temperature and 2 ml of a 4:1 hexane:chloroform mixture was added, agitated for 2 min, and centrifuged. The upper phase was removed and the process was repeated twice (LEWIS *et al.*, 2000).

2.7. *Fatty acid analysis*

The FA profile was analyzed using a Varian Star 3600 CX gas chromatograph system with a flame ionization detector (FID) and a J & W Scientific DB-23 column, 30 m x 0.53 mm. Helium was used as the mobile phase (15 psi, split 1/100) at temperatures of 250 °C in the injector and 300 °C in the detector. The temperature ramp for the column was as follows: an initial temperature of 50 °C for 2 min, a gradient of 10 °C/min from 50 °C to 180 °C with a standby time of 5 min, and a gradient of 5 °C/min from 180 °C to 240 °C, totaling 32 min of chromatographic run. The injection volume was 1 µL. A standard

Supelco 37 Component FAME Mix (10mg.mL⁻¹ in CH₂Cl₂ (47885-U) containing methyl esters ranging from C4:0 to C24:1 was used to identify the retention time for FAME peak integration.

Furthermore, the FAs present in the samples were identified by a Shimatzu GC-2010 Plus with MS detector and a Stabilwax capillary column, 30 m x 0.25 mm I.D., 0.25 µm. The electron ionization energy was 70 eV. Helium was used as the mobile phase (15 psi, split 1/50) at temperatures of 250 °C in the injector and 300 °C in the detector. The temperature programming for the column was 50 °C for 2 min, a gradient of 10 °C/min from 50 °C to 180 °C with a standby time of 5 min, and a gradient of 5 °C/min from 180 °C to 240 °C, totaling 32min of chromatographic run. The injection volume was 1 µl. GC-MS solution software (Shimadzu, Kyoto, Japan) was used for GC-MS analysis and the libraries used for comparison were Nist08 and Nist08s.

2.8. Biodiesel quality analysis

Models used to predict the biodiesel quality parameters are shown in **Table 5.2**.

Cetane number (CN) is the most important property for specifying biodiesel quality. Several methods, e.g. ASTM D 613 and ISO 5165, were standardized to determine this property. However, experimental determination of the cetane number is an expensive and time-consuming process (GOPINATH *et al.*, 2009). Different models for predicting cetane number have been studied and their ability to predict the quality of biodiesel validated (GOPINATH *et al.*, 2009). In this work, two correlations were used to predict cetane number.

A multiple linear regression model (Equation 5.1) was developed to predict the cetane numbers of biodiesels from their FA compositions. The equation yielded an R² value of 0.953 and less than an 8% difference between the predicted and measured cetane numbers of fifteen different biodiesels (including three blends) (GOPINATH *et al.*, 2009).

Using Equation 5.2 the cetane number is estimated based on the linear mixing rules used to predict biodiesel quality with good correlation with the measured values

(PEREYRA-IRUJO *et al.*, 2009; RAMOS *et al.*, 2009). Under the linear mixing rules, mixture properties are obtained by multiplying the component properties by the component concentrations in the mixture (PEREYRA-IRUJO *et al.*, 2009; PRATAS *et al.*, 2011).

Table 5.2: Prediction models for biodiesel quality properties.

Parameter	Model	Nº
Cetane number	$CN = 62.2 + (0.017C_{12:0}) + (0.074C_{14:0}) + (0.115C_{16:0}) + (0.177C_{18:0}) - (0.103C_{18:1}) - (0.279C_{18:2}) - (0.366C_{18:3})$	(5.1)
Cetane number	$CN = \sum \frac{CN_{ME} \%ME}{100}$	(5.2)
Density	$\rho = \sum \frac{\rho_{ME} \%ME}{100}$	(5.3)
Heat of combustion	$\Delta H_C = \sum \frac{\Delta H_{C_ME} \%ME}{100}$	(5.4)
Oxidative stability	$OSI = \sum \frac{OSI_{ME} \%ME}{100}$	(5.5)
Lubricity	$Lub = \sum \frac{Lub_{ME} \%ME}{100}$	(5.6)
Viscosity	$\ln(v) = \sum \frac{\ln(v_{ME}) \%ME}{100}$	(5.7)
Cold filter plugging point	$CFPP = 3.1417(0.1C_{16:0} + 0.5C_{18:0} + 1.0C_{20:0} + 1.5C_{22:0} + 2.0C_{24:0}) - 16.477$	(5.8)
Iodine Index	$II = \sum \frac{254 \cdot N_{L=} \%ME}{MM_{ME}}$	(5.9)

$C_{12:0}$, $C_{14:0}$, $C_{16:0}$, $C_{18:0}$, $C_{18:1}$, $C_{18:2}$, $C_{18:3}$, $C_{20:0}$, $C_{22:0}$, $C_{24:0}$ are the weight percentages of lauric, myristic, palmitic, stearic, oleic, linoleic, linolenic, arachidic, behenic, and lignoceric acid methyl esters in biodiesel. %ME and 'N_{L=}' represent the percentages and the number of double bonds of each methyl ester in biodiesels. CN, ρ , ΔH_C , OSI, Lub, v , MM are the predicted cetane number, density, heat of combustion, oxidative stability, lubricity, viscosity and molecular weight of the biodeisel. CN_{ME} , ρ_{ME} , ΔH_{C_ME} , OSI_{ME} , Lub_{ME} , v_{ME} , MM_{ME} are the different properties of individual methyl esters.

Other properties can also be estimated with the linear mixing rules (Equations 5.3-5.6): density (ρ) (PEREYRA-IRUJO *et al.*, 2009; PRATAS *et al.*, 2011), heat of

combustion (ΔH_c) (PEREYRA-IRUJO *et al.*, 2009), oil stability index (*OSI*), and lubricity (*Lub*). The major drawback in the application of linear mixing rules for predicting density is the assumption that the excess volumes in the mixture are negligible (PRATAS *et al.*, 2011). However, biodiesels are simple mixtures, generally composed of less than ten FA esters all of the same family, and consequently, excess volumes are very small. A logarithmic rule was used for predicting viscosity (ν) with an average prediction error of $\pm 3.7\%$ in Equation 5.7 (ALLEN *et al.*, 1999; PEREYRA-IRUJO *et al.*, 2009).

Cold filter plugging point (CFPP) is defined as the lowest temperature at which 20 mL of sample safely passes through the filter within 60s (European norm EN 116). In order to improve the prediction of CFPP, this parameter was correlated only with the composition of saturated methyl esters. The correlation between the CFPP and the saturated methyl ester content is $R^2 = 0.966$. From these results, it is possible to directly predict the CFPP of biodiesels from the content of saturated methyl esters (Equation 5.8) (RAMOS *et al.*, 2009).

The iodine index (*II* - Equation 5.9) is directly related to the degree of instauration or number of double bonds in the oil (GOPINATH *et al.*, 2009).

2.9. Kinetic parameter analysis

2.9.1. Cell growth

Specific growth rates (μ) at different times (t) were determined numerically after fitting the cell mass concentration (X) to a polynomial function and performing further calculations according to the equation:

$$\mu = \frac{1}{X} \frac{dX}{dt} \quad (5.10)$$

Lag phase duration (λ), maximum values of specific growth rate (μ_{\max}), and maximum cell concentration (X_{\max}) were predicted by the modified Gompertz model represented below (ZWIETERING *et al.*, 1990) as a function of initial cell concentration (X_0) and cell concentration at different times ($X_{t_predicted}$, t):

$$\ln\left(\frac{X_{t_predicted}}{X_0}\right) = \ln\left(\frac{X_{max}}{X_0}\right) \cdot \exp\left(-\exp\left(\frac{\mu_{max} \cdot \exp(1)}{\ln\left(\frac{X_{max}}{X_0}\right)}(\lambda - t) + 1\right)\right) \quad (5.11)$$

The Newton-Raphson method was used to solve Equation (5.11) using Microsoft Excel 7 software and find the values of the parameters that minimize the sum of the root mean square error between the observed and predicted values. Initial estimates of the parameters were required, and the choice of these values is critical because a poor starting point can result in divergence or an incorrect solution (LACERDA *et al.*, 2011). A reasonable initial estimate for the coefficient was obtained through the graph (ln X) vs. (t).

The coefficient of determination (R^2) is an optimistic estimate of the quality of a linear regression between the predicted values ($X_{t_predicted}$) and the observed values ($X_{t_observed}$). This parameter was used to validate the model results.

$$R^2 = \frac{(\sum(X_{t_predicted} - \overline{X_{predicted}})(X_{t_observed} - \overline{X_{observed}}))^2}{\sum(X_{t_predicted} - \overline{X_{predicted}})^2 \sum(X_{t_observed} - \overline{X_{observed}})^2} \quad (5.12)$$

Generation time (tg) is the time necessary to double the value of cell concentration, assuming that the specific growth rate is constant and maximum (μ_{max}). Applying this definition to Equation 10, separating the variables, and performing the integration, we obtain

$$tg = \frac{\ln(2)}{\mu_{max}} \quad (5.13)$$

Biomass productivity (P_X) is the product of cell mass concentration (X) and specific growth rate (μ):

$$P_X = \mu \cdot X \quad (5.14)$$

2.9.2. **Lipid accumulation**

The lipid content (%Lipid) of the microalgae was calculated by the ratio between lipid weight (W_L) and dry biomass weight (W_X).

$$\%Lipid = \frac{W_L}{W_X} \quad (5.15)$$

Lipid productivity (P_L) was determined as a function of lipid content (%Lipid), maximum cell concentration (X_{max}), and the full batch time (T_r):

$$P_L = \frac{X_{max} \cdot \%Lipids}{T_r} \quad (5.16)$$

3. Results and Discussion

3.1. Lipid profile and biodiesel quality

Results of the FAME profile in different experiments are shown in **Table 5.3**. It is important to point out that a mass detector was used to identify the FAs in the samples to avoid being unable to identify or incorrectly identifying the compounds. This can occur when the compounds are identified only by retention times with a mixture of standards that may not contain all the compounds present in samples of microalgae, such as C16:2 and C16:3, or may contain compounds that have the same retention time, such as C17:1 and C16:3.

Table 5.3: FAME profile of *Chlorella vulgaris*.

NaNO ₃ (g.L ⁻¹)	FAMES (%)												
	C5:0	C16:0	C16:1	C16:2	C16:3	C18:0	C18:1	C18:2	C18:3	Others	SFA	MUFA	PUFA
0.25	0.51	25.18	0.81	1.36	5.32	5.99	40.89	6.12	12.72	1.11	31.68	41.70	25.52
0.37	0.86	25.17	0.97	1.80	5.21	5.95	35.12	7.20	16.60	1.13	31.97	36.09	30.81
0.50	1.60	20.77	0.85	3.13	5.09	8.62	31.70	10.61	16.52	1.12	30.99	32.55	35.35
0.75	2.46	20.02	0.91	5.98	5.90	7.83	21.04	17.01	17.64	1.19	30.32	21.95	46.54
1.00	2.92	19.34	0.87	7.49	7.27	5.33	14.99	20.12	20.28	1.40	27.59	15.86	55.15
Methyl levulinate (C5:0); Methyl palmitate (C16:0); Methyl palmitoleate (C16:1); Methyl hexadecadienoate (C16:2); Methyl hexadecatrienoate (C16:3); Methyl stearate (C18:0); Methyl oleate (C18:1); Methyl linoleate (C18:2); Methyl linolenate (C18:3); Saturated fatty acid (SFA); Monounsaturated fatty acid (MUFA); Polyunsaturated fatty acid (PUFA).													

The FAMES accumulated were C16:0, C16:1, C16:2, C16:3, C18:0, C18:1, C18:2, and C18:3 and others in small amounts. The same methyl esters were found in *Chlorella vulgaris* by Petkov and Garcia (PETKOV e GARCIA, 2007). Based on these

experiments it is possible to conclude that a decrease in initial NaNO_3 concentration has a positive effect on the accumulation of C16:0 and C18:1 and a negative effect on the accumulation of C16:2, C16:3, C18:2, and C18:3 FAMES.

The FAMES most commonly found in biodiesel are C16:0, C18:0, C18:1, C18:2, and C18:3, but a variety of other FAMES can be found in small amounts in all oils and fats used as biodiesel sources (KNOTHE, 2008). It is important to note that these FAMES represent between 90% ($0.25 \text{ g}_{\text{NaNO}_3} \cdot \text{L}^{-1}$) and 80% ($1.00 \text{ g}_{\text{NaNO}_3} \cdot \text{L}^{-1}$), indicating the positive effect on this accumulation of a decrease in the initial NaNO_3 concentration (Figure 5.1).

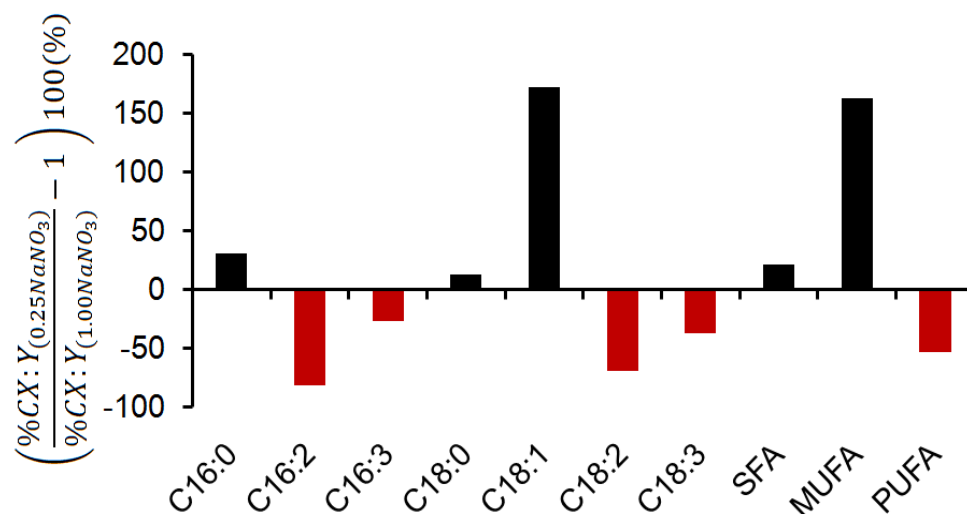


Figure 5.1: Effects of FAME accumulation in the experiments with $0.25 \text{ g}_{\text{NaNO}_3} \cdot \text{L}^{-1}$ and $1.00 \text{ g}_{\text{NaNO}_3} \cdot \text{L}^{-1}$.

Two advantages can be cited in relation to the differences shown in Figure 5.1. The first is the increases of 173% and 30% in the respective concentrations of C18:1 and C16:0, compounds that are considered suitable for improving the quality of biodiesel. The second is the decreases of 70% and 38% in the respective concentrations of C18:2 and C18:3. This lipid profile is in accordance with the literature (YEH e CHANG, 2011). It is important to point out that C18:3 is limited to 12% by EN14214 due to its high rate of oxidation and reduction in the quality of biodiesel.

After identifying the FAMES in each sample, the properties of these esters were obtained from the literature (KNOTHE, G., GERPEN, J.V., KRAHL, J., 2005; MOSER, 2009a; LAPUERTA *et al.*, 2010) and are presented in **Table 5.4**. These data were used to estimate the quality of biodiesel, as detailed in the Material and Methods section. **Table 5.5** contains the results of these calculations and the quality limits of the standards. Literature on C5:0, C16:2, and C16:3 is scarce. For this reason, some of the properties of C5:0 were estimated by C4:0 properties and some of the properties of C16:2 and 16:3 were estimated by the geometric proportion between the values of C18:0 to C18:3 and the values of C16:0 to C16:3.

Table 5.4: FAME properties obtained from sources in the literature.

FAME	Formula	MW (g/mol)	ρ (kg/m ³)	ν (mm ² .s)	ΔH_c (kJ/g)	OSI (h)	Cetane Number	Lubricity (μ m)
Methyl levulinate	C ₆ H ₁₀ O ₃	130.14	875 ^b	0.53 ^f	28.08 ^f	>40 ^e	17.8 ^f	357 ^f
Methyl palmitate	C ₁₇ H ₃₄ O ₂	270.46	852 ^b	4.32 ^a	39.47 ^a	>40 ^c	74.5 ^a	357 ^c
Methyl palmitoleate	C ₁₇ H ₃₂ O ₂	268.44	875 ^b	3.67 ^c	39.32 ^a	2.1 ^c	51 ^a	246 ^c
Methyl hexadecadienoate	C ₁₇ H ₃₀ O ₂	266.42	900 ^b	3.08 ^d	39.14 ^d	0.49 ^d	33.1 ^d	211 ^d
Methyl hexadecatrienoate	C ₁₇ H ₂₈ O ₂	264.10	911 ^b	2.59 ^d	38.86 ^d	0.15 ^d	20.7 ^d	168 ^d
Methyl stearate	C ₁₉ H ₃₈ O ₂	298.51	850 ^b	4.74 ^a	40.10 ^a	>40 ^c	101 ^a	322 ^c
Methyl oleate	C ₁₉ H ₃₆ O ₂	296.49	874 ^b	4.51 ^a	39.93 ^a	2.50 ^c	59.3 ^a	290 ^c
Methyl linoleate	C ₁₉ H ₃₄ O ₂	294.48	889 ^b	3.27 ^a	39.72 ^a	1.00 ^c	42.2 ^a	236 ^c
Methyl linolenate	C ₁₉ H ₃₂ O ₂	292.46	895 ^b	3.14 ^a	39.37 ^a	0.20 ^c	22.7 ^a	183 ^c

'MW' Molecular Weight, ' ρ ' density, ' ν ' viscosity, ' ΔH_c ' heat of combustion, 'OSI' oxidative stability index.

Source: ^a (KNOTHE, G., GERPEN, J.V., KRAHL, J., 2005); ^b (LAPUERTA *et al.*, 2010); ^c (MOSER, 2009a); ^d geometric proportion between the values of C18:0 to C18:3 applied to C16:0 to C16:3, ^e (MOSER, 2009b), ^f C5:0 properties were estimated by C4:0 properties.

The cetane number is directly related to the ignition delay time, i.e. the time from injection of the fuel into the cylinder to the onset of ignition (BUCY *et al.*, 2012). The shorter the ignition delay time, the higher the cetane number is, and vice versa (GOPINATH *et al.*, 2009). In addition, very high or very low cetane numbers may cause incomplete combustion, smoke, and malfunction of the engines (KNOTHE, G., GERPEN, J.V., KRAHL, J., 2005). The cetane number showed a linear and positive correlation with the decrease in initial nitrate concentration for the models presented (Equations 1 and 2). The results predicted by Equations 5.1 and 5.2 differ by less than

3% on average. In this case, the values predicted by Equation 5.1 were compared with those given in the quality standards, and in all cases, were found to meet the quality standards ANP 255/2003 (CN>45), ASTM D6751 (CN>47), and (EN14214>51).

Table 5.5: Predicted properties of *C. vulgaris* biodiesel.

NaNO ₃ (g/L)	ρ (kg/m ³)	ν (mm ² .s)	ΔH _c (kJ/g)	OSI (h)	CN		Lubricity (μm)	II (g _{I2} /100g)	CFPP (°C)
					(1)	(2)			
<u>NaNO₃(g.L⁻¹)</u>									
0.25	863	3.93	39.2	13.8	56	57	281	97	0.8
0.37	864	3.83	39.1	13.8	54	55	276	105	0.8
0.50	865	3.72	39.0	13.4	54	54	272	110	3.6
0.75	867	3.51	38.8	12.9	53	51	264	123	2.1
1.00	868	3.35	38.6	11.7	51	47	255	136	-2.0
<u>Standards</u>									
ASTM D6751	-	1.9-6.0	-	Min 3	Min 47		-	-	-
EN14213	860-900	3.5-5.0	35	Min 4	-		-	Max 130	-
EN 14214	860-900	3.5-5.0	-	Min 6	Min 51		-	Max 120	-
ANP 255/2003	-	-	-	-	Min 45		-	-	-

' ρ ' density, ' ν ' viscosity, ' ΔH_c ' heat of combustion, 'OSI' oxidative stability index, 'II' Iodine Index, 'CFPP' cold filter plugging point.

Viscosity is a measure of the resistance of a fluid to flow. Viscosities below the established range (1.6-6 mm².s) can cause excessive wear, leakage in the fuel pump, and damage to the piston. Viscosities above this range may force the fuel pump, causing the deposition of debris inside the engine, and incomplete combustion may occur, increasing the emission of smoke and particulate matter (BALAT e BALAT, 2010). Viscosity showed a linear and positive correlation with decreasing initial nitrate concentration, and in all cases analyzed, the predicted values of viscosity met quality standard ASTM D6751 (1.9-6.0 mm².s). For standards EN 14214 and EN 14213 (3.5-5.0 mm².s), only the experiments carried out with initial NaNO₃ concentrations between 0.25 and 0.75 are in accordance with the established values.

The heat of combustion is important for estimating fuel consumption, since the higher the value of this parameter the lower the fuel consumption. ASTM D6751 and EN 14214 do not delimit values; however, EN 14213 specifies a minimum of 35 MJ/kg for biodiesel used as fuel. According to the calculations, the heat of combustion meets the

specifications, since in all cases values obtained were >38 MJ/kg. The difference between the predicted values is less than 3%, indicating that initial NaNO_3 concentration had little effect in the cases tested.

Oxidative stability is critical issue in the storage, handling and use because decomposition byproducts can form insoluble sediments that are capable of sediment in tanks, plugging filters, fouling injectors, and interfering with engine performance (BUCY *et al.*, 2012). The double bonds in biodiesel can be oxidized by air (KNOTHE e STEIDLEY, 2009). This reaction can occur at different rates, depending on the number and position of the double bonds. The relative rates of oxidation of methyl oleate (C18:1), methyl linoleate (C18:2), and methyl linolenate (C18:3) are 1, 41, and 98, respectively (KNOTHE, G., GERPEN, J.V., KRAHL, J., 2005).

Therefore, an evaluation of the oxidation stability index is necessary because the biodiesel esters contain large amounts of oleic, linoleic, and linolenic acids that directly affect their stability during oxidation (KNOTHE, G., GERPEN, J.V., KRAHL, J., 2005). According to the calculations, the values for this parameter were greater than 11 hours in all cases, and thus above the minimum limits established by EN14214 (6 h) and EN14213 (4 h).

Several definitions can be used to describe the parameter lubricity, including "Lubricity is the ability to reduce friction between solid surfaces in relative motion" or a "quality that prevents wear when two moving parts of metal come into contact" (KNOTHE, G., GERPEN, J.V., KRAHL, J., 2005). Lubricity was not included in the quality standards specification for biodiesel, though it is an advantage of biodiesel over petroleum diesel (KNOTHE, G., 2005). The decrease in initial nitrate concentration showed a linear and positive correlation with this property, and the results were greater than $255 \mu\text{m}$.

Density is directly linked to volume of fuel injected engines, and variations in density lead to a significant change in mass of fuel injected. According to the calculations, the density met the standards ($860\text{-}900 \text{ kg/m}^3$) in all cases. However, the difference between the predicted values is less than 1%, indicating little effect of the initial NaNO_3 concentration in the cases tested.

The iodine value is used to determine the degree of unsaturation due to the large effect of this parameter on the properties of biodiesel (RAMOS *et al.*, 2009). According to the calculations, the iodine value was below the maximum established by EN14214 (Max 120 gI₂/100g) for 0.25 to 0.50 g_{NaNO₃}·L⁻¹ and EN14213 (Max 130 gI₂/100g) for 0.25 to 0.75 g_{NaNO₃}·L⁻¹. The increase in initial nitrate concentration showed a linear and positive correlation with the iodine value.

Linolenic acid methyl ester content is restricted only by EN 14214 because of the propensity of methyl linolenate to oxidize. The limit is 12%. In all cases, the percentage of this compound was above that specified by the standard. The decrease in initial nitrate concentration showed a negative correlation for this property.

Another important factor to evaluate is the fuel's behavior at low temperatures, as biodiesel tends to partially solidify or lose its fluidity, thereby interrupting the fuel flow and clogging the filtration system, causing engine starting problems (KLEINOVÁ *et al.*, 2007; LÔBO *et al.*, 2009). The cold filter plugging point is the temperature at which the fuel can no longer be filtered when cooled (KLEINOVÁ *et al.*, 2007; LÔBO *et al.*, 2009). Since this parameter depends on region and season, the values need to be evaluated according to the place of use of the biodiesel.

These results were obtained from the profile composition of the sample obtained in the laboratory, the data from the literature on the properties of each compound, and the prediction models for each biodiesel quality parameter representing a theoretical estimate. Thus, the quality of these predicted values is directly related to the accuracy of the values obtained from the literature and the correlation equations used.

3.2. Biomass growth and lipid content

Different NaNO₃ concentrations in the culture media of *Chlorella vulgaris* were investigated. Experiments were carried out until the stationary phase of cell growth was reached to predict the impact of nitrogen concentration on cell growth, lipid accumulation, FA profile, and quality of the biodiesel from *Chlorella vulgaris*. This growth phase was chosen since several studies indicate the possibility of obtaining between 4

and 30 times more total FAs and between 5 and 40 times more total neutral lipids in the stationary phase than in the exponential phase of cell growth (LV *et al.*, 2010).

Mathematical modeling was used to predict cellular growth by estimating maximum specific growth rate, maximum cell concentrations, and duration of lag phase (LACERDA *et al.*, 2011). In **Figure 5.2** the fit of the mathematical models to the different conditions tested is shown. Visual analysis of the data shows the satisfactory fit of the model to the experimental data. Statistical analysis of the model suggests an optimal agreement between predicted and observed data, $0.994 < R^2 < 0.998$. Thus, the modified Gompertz model provided a good fit to the growth data for *Chlorella vulgaris*, both in terms of statistical accuracy and ease of use. **Table 5.6** contains data obtained with the modified Gompertz model (X_{\max} , λ , μ_{\max}), generation time, maximum pH, percentage of lipids in the stationary phase, and maximum biomass and lipid productivities for the experiments. The pH, biomass concentration, and productivity obtained for each sample time and biomass concentration and productivity predicted by the modified Gompertz model for each time are shown in **Figure 5.3**.

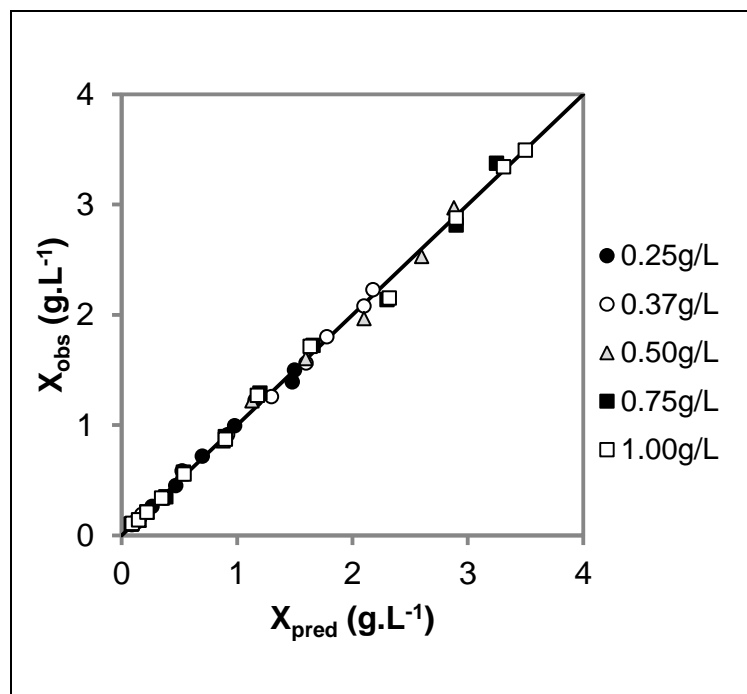


Figure 5.2: Comparison of observed values (X_{obs}) and model predicted values (X_{pred}) of biomass concentration for different initial concentrations of NaNO_3 .

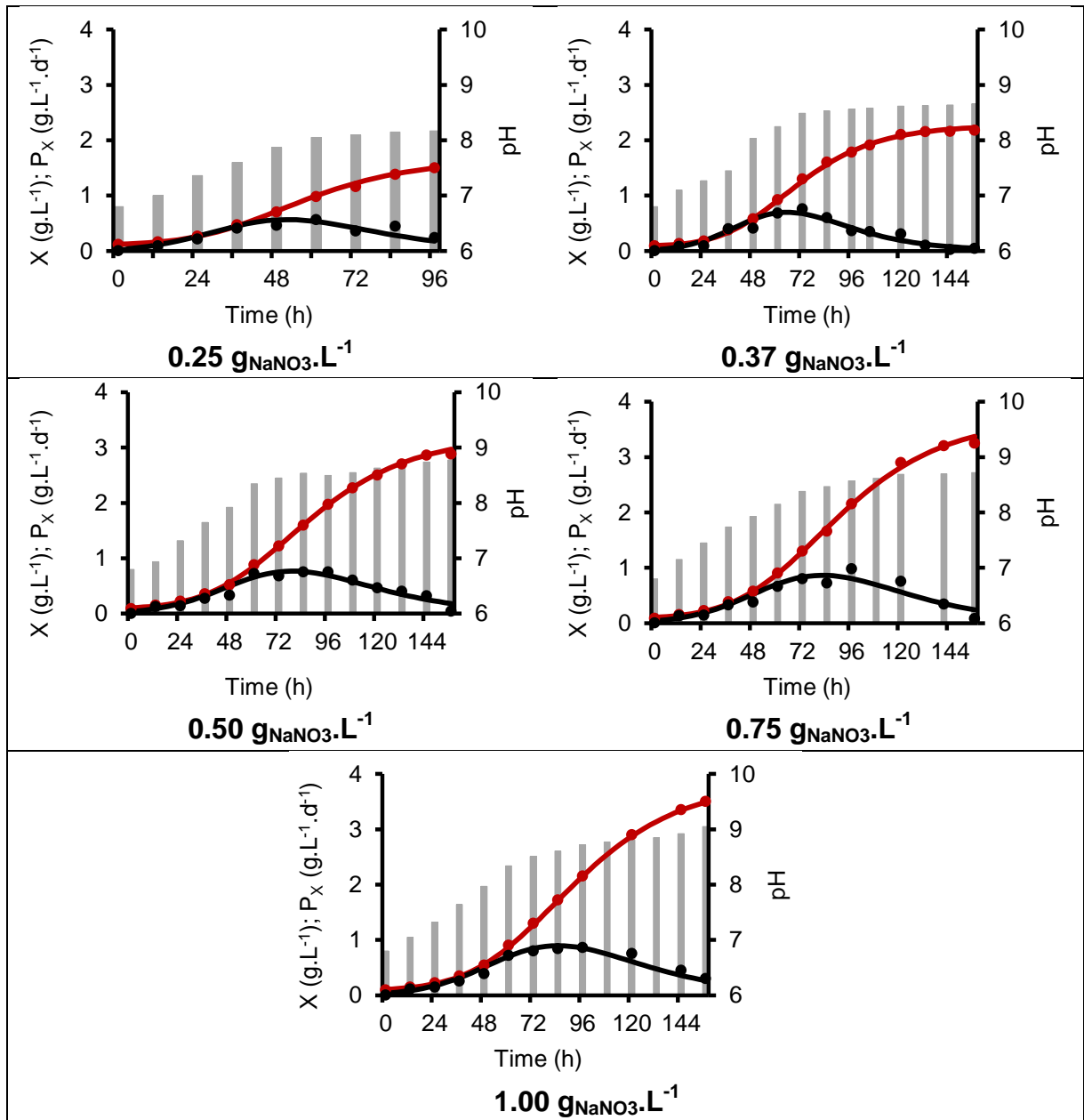


Figure 5.3: Comparison of pH profile, biomass growth, and productivity. [‘—’: X_{pred} (g.L^{-1}); ‘●’: X_{obs} (g.L^{-1}); ‘—’: P_{X_pred} ($\text{g.L}^{-1}.\text{d}^{-1}$); ‘●’: P_{X_obs} ($\text{g.L}^{-1}.\text{d}^{-1}$); ‘█’: pH].

In order to understand the effect of NaNO_3 concentration on the biomass culture, the following ranges were used: a maximum cell concentration between 1.6 and 3.79 g.L^{-1} , a maximum biomass productivity between 0.567 and $0.869 \text{ g.L}^{-1}.\text{d}^{-1}$, a pH between 8.15 and 9.05, and a full batch time between 4 and 6.5 days. The maximum and

minimum values of these parameters were obtained using 1.00 and 0.25 g_{NaNO₃}.L⁻¹, respectively. The X_{\max} , $P_{X_{\max}}$, pH_{\max} , and R_t values increased linearly between the experiments carried out with 0.25 and 0.50 g_{NaNO₃}.L⁻¹. However, the responses X_{\max} , $P_{X_{\max}}$, pH_{\max} , and R_t were very close in the experiments with 0.75 and 1.00 g_{NaNO₃}.L⁻¹, indicating that despite the increased availability of nitrogen, another factor was limiting growth. This can be explained by the reduced availability of light at the center of the reactor and the unavailability of other nutrients such as phosphorus.

Table 5.6: Growth data on *C. vulgaris* in different experiments.

NaNO ₃ (g.L ⁻¹)	X_{\max} (g.L ⁻¹)	λ (d)	μ_{\max} (d ⁻¹)	tg (d)	pH _{max}	Lipids (%)	$P_{X_{\max}}$ (g.L ⁻¹ .d ⁻¹)	P_L (g.L ⁻¹ .d ⁻¹)	R_t (d)	Lipids (g.L ⁻¹)
0.25	1.60	0.29	1.20	0.58	8.15	50	0.567	0.200	4.0	0.8
0.37	2.10	0.38	1.18	0.59	8.69	38	0.699	0.160	5.0	0.8
0.50	3.20	0.13	1.02	0.68	8.92	33	0.769	0.162	6.5	1.1
0.75	3.70	0.13	1.00	0.69	8.80	30	0.865	0.171	6.5	1.1
1.00	3.79	0.11	1.00	0.69	9.05	27	0.869	0.157	6.5	1.0

' X_{\max} ' maximum cell concentration, ' λ ' lag phase duration, ' μ_{\max} ' maximum specific growth rate, 'tg' generation time, 'pH_{max}' maximum pH value, 'Lipids' lipid percentage, ' $P_{X_{\max}}$ ' maximum biomass productivity, ' P_L ' maximum lipid productivity, ' R_t ' full batch time, 'Lipids' maximum lipids accumulated.

The lag phase ranged between 0.29 d and 0.11 d and the maximum specific growth rate ranged between 1.20 and 1.00 d⁻¹ (0.25 g_{NaNO₃}.L⁻¹ to 1.00 g_{NaNO₃}.L⁻¹), indicating that the reduction in initial nitrogen concentration caused an increase in the adaptation period of the microorganism and in the growth rates (**Figure 5.2**). The maximum specific growth rate and generation time were inversely proportional, and the results obtained for generation time ranged between 0.58 and 0.69 d (0.25 g_{NaNO₃}.L⁻¹ to 1.00 g_{NaNO₃}.L⁻¹).

The total lipid content in the dry biomass varied from 27% to 50% and the lipid productivity varied from 0.157 to 0.200 g.L⁻¹.d⁻¹ (from 1.00 g_{NaNO₃}.L⁻¹ to 0.25 g_{NaNO₃}.L⁻¹, respectively). The amount of lipids in *Chlorella* cells decreased almost linearly during the experiments carried out with 0.25 and 1.0 g_{NaNO₃}.L⁻¹. The highest lipid content and productivity were obtained using 0.25 g_{NaNO₃}.L⁻¹, which could produce high-quality biodiesel using *Chlorella vulgaris* as a raw material.

Therefore, the results indicate that an increase in NaNO_3 concentration had a positive effect on cell growth and a negative effect on lipid accumulation. The reason is the link between carbon and nitrogen metabolism in microalgae (LI *et al.*, 2008; PEREZ-GARCIA *et al.*, 2011).

Several studies carried out with *Chlorella vulgaris* under different growth conditions have evaluated biomass productivity, lipid productivity, and lipid content. An increase in lipid content from 5.9% to 15.31% was obtained by decreasing the initial nitrate concentration in the medium from $1.50 \text{ g}_{\text{NaNO}_3} \cdot \text{L}^{-1}$ to $0.375 \text{ g}_{\text{NaNO}_3} \cdot \text{L}^{-1}$ (CONVERTI *et al.*, 2009). Using different concentrations of urea ($0.025 \text{ g}_{\text{urea}} \cdot \text{L}^{-1}$ to $0.200 \text{ g}_{\text{urea}} \cdot \text{L}^{-1}$) to promote biomass growth, in six days a lipid content between 32.6% and 66% and a lipid productivity of $0.051 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1} \cdot \text{d}^{-1}$ and $0.110 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1} \cdot \text{d}^{-1}$ were obtained (HSIEH e WU, 2009). LV *et al.* (2010) reported an increase in biomass productivity and a decrease in lipid content with the highest amounts of KNO_3 . LIANG *et al.* (2009) obtained a biomass productivity of $0.01 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1} \cdot \text{d}^{-1}$, a lipid content of 38%, and a lipid productivity of $0.004 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1} \cdot \text{d}^{-1}$ with *Chlorella vulgaris* cultivated with air and $0.25 \text{ g}_{\text{NaNO}_3} \cdot \text{L}^{-1}$. However, these parameters are affected by a variety of factors, such as type and availability of nutrients provided (mainly carbon, nitrogen, and phosphorus), temperature, light intensity, culture age, and environmental stress. Thus, it is very difficult to compare the values obtained with those in the literature.

4. Conclusions

With this analysis it was possible to verify the effect of initial NaNO_3 concentration on biomass growth, lipid content, and biodiesel quality where a decrease in nitrate availability of 75% caused an 85% increase in lipid content; a 27.4% increase in lipid productivity; and increases in C18:1, C16:0, and C18:0 concentrations of 173%, 30%, and 12%, respectively. Furthermore, it caused a decrease in biomass concentration of 57.8%, in biomass productivity of 34.8%, in full batch time 38.5%, and in the C18:2 and C18:3 concentrations of 70% and 38%, respectively. The best values for biodiesel quality were obtained with $0.25 \text{ g}_{\text{NaNO}_3} \cdot \text{L}^{-1}$.

5. Acknowledgement

Funding for this research was provided by the Fundação de Amparo a Pesquisa no Estado de São Paulo, FAPESP (Brazil); Capes; CNPQ and PETROBRAS.

6. References

AHMAD, A. L.; YASIN, N. H. M.; DEREK, C. J. C.; LIM, J. K. Microalgae as a sustainable energy source for biodiesel production: A review. **Renewable and Sustainable Energy Reviews**, v. 15, n. 1, p. 584-593, 2011.

ALLEN, C. A. W.; WATTS, K. C.; ACKMAN, R. G.; PEGG, M. J. Predicting the viscosity of biodiesel fuels from their fatty acid ester composition. **Fuel**, v. 78, n. 11, p. 1319-1326, 1999.

BALAT, M.; BALAT, H. Progress in biodiesel processing. **Applied Energy**, v. 87, n. 6, p. 1815-1835, 2010.

BLIGH, E. G.; DYER, W. J. A rapid method of total lipid extraction and purification. **Canadian Journal of Biochemistry and Physiology**, v. 37, n. 8, p. 911-917, 1959.

BUCY, H. B.; BAUMGARDNER, M. E.; MARCHESE, A. J. Chemical and physical properties of algal methyl ester biodiesel containing varying levels of methyl eicosapentaenoate and methyl docosahexaenoate. **Algal Research**, v. 1, n. 1, p. 57-69, 2012.

CONVERTI, A.; CASAZZA, A. A.; ORTIZ, E. Y.; PEREGO, P.; DEL BORGHI, M. Effect of temperature and nitrogen concentration on the growth and lipid content of *Nannochloropsis oculata* and *Chlorella vulgaris* for biodiesel production. **Chemical Engineering and Processing: Process Intensification**, v. 48, n. 6, p. 1146-1151, 2009.

GOPINATH, A.; PUHAN, S.; NAGARAJAN, G. Relating the cetane number of biodiesel fuels to their fatty acid composition: A critical study. **Proceedings of the Institution of Mechanical Engineers, Part D: Journal of Automobile Engineering**, v. 223, n. 4, p. 565-583, 2009.

HSIEH, C.-H.; WU, W.-T. Cultivation of microalgae for oil production with a cultivation strategy of urea limitation. **Bioresource Technology**, v. 100, n. 17, p. 3921-3926, 2009.

HU, Q.; SOMMERFELD, M.; JARVIS, E.; GHIRARDI, M.; POSEWITZ, M.; SEIBERT, M.; DARZINS, A. Microalgal triacylglycerols as feedstocks for biofuel production: perspectives and advances. **The Plant Journal**, v. 54, n. 4, p. 621-639, 2008.

JACOB-LOPES, E.; LACERDA, L. M. C. F.; FRANCO, T. T. Biomass production and carbon dioxide fixation by *Aphanothece microscopica* Nägeli in a bubble column photobioreactor. **Biochemical Engineering Journal**, v. 40, n. 1, p. 27-34, 2008.

KLEINOVÁ, A.; PALIGOVÁ, J.; CVENGROŠ, T.; CVENGROŠ, M.; MIKULEC, J.; ŠIMON, P.; CVENGROŠ, J. Cold Flow Properties of Fatty Esters. **Process Safety and Environmental Protection**, v. 85, n. 5, p. 390-395, 2007.

KNOTHE, G. Dependence of biodiesel fuel properties on the structure of fatty acid alkyl esters. **Fuel Processing Technology**, v. 86, n. 10, p. 1059-1070, 2005.

KNOTHE, G. "Designer" Biodiesel: Optimizing fatty ester composition to improve fuel properties. **Energy Fuels**, v. 22, p. 1358–1364, 2008.

KNOTHE, G., GERPEN, J.V., KRAHL, J. **The biodiesel Handbook**. AOCS Press, 2005.

KNOTHE, G.; MATHEAUS, A. C.; RYAN, T. W. Cetane numbers of branched and straight-chain fatty esters determined in an ignition quality tester[small star, filled]. **Fuel**, v. 82, n. 8, p. 971-975, 2003.

KNOTHE, G.; STEIDLEY, K. R. A comparison of used cooking oils: A very heterogeneous feedstock for biodiesel. **Bioresource Technology**, v. 100, n. 23, p. 5796-5801, 2009.

LACERDA, L. M. C. F.; QUEIROZ, M. I.; FURLAN, L. T.; LAURO, M. J.; MODENESI, K.; JACOB-LOPES, E.; FRANCO, T. T. Improving refinery wastewater for microalgal biomass production and CO₂ biofixation: Predictive modeling and simulation. **J Petrol Sci Eng**, v. 78, n. 3-4, p. 679-686, 2011.

LAPUERTA, M.; RODRÍGUEZ-FERNÁNDEZ, J.; ARMAS, O. Correlation for the estimation of the density of fatty acid esters fuels and its implications. A proposed Biodiesel Cetane Index. **Chemistry and Physics of Lipids**, v. 163, n. 7, p. 720-727, 2010.

LEWIS, T.; NICHOLS, P. D.; MCMEEKIN, T. A. Evaluation of extraction methods for recovery of fatty acids from lipid-producing microheterotrophs. **Journal of Microbiological Methods**, v. 43, n. 2, p. 107-116, 2000.

LI, Y.; HORSMAN, M.; WANG, B.; WU, N.; LAN, C. Effects of nitrogen sources on cell growth and lipid accumulation of green alga *Neochloris oleoabundans*. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v. 81, n. 4, p. 629-636, 2008.

LIANG, Y.; SARKANY, N.; CUI, Y. Biomass and lipid productivities of *Chlorella vulgaris* under autotrophic, heterotrophic and mixotrophic growth conditions. **Biotechnology Letters**, v. 31, n. 7, p. 1043-1049, 2009.

LÔBO, I. P.; FERREIRA, S. L. C.; CRUZ, R. S. D. Biodiesel: parâmetros de qualidade e métodos analíticos. **Química Nova**, v. 32, p. 1596-1608, 2009.

LV, J.-M.; CHENG, L.-H.; XU, X.-H.; ZHANG, L.; CHEN, H.-L. Enhanced lipid production of *Chlorella vulgaris* by adjustment of cultivation conditions. **Bioresource Technology**, v. 101, n. 17, p. 6797-6804, 2010.

MATA, T. M.; MARTINS, A. A.; CAETANO, N. S. Microalgae for biodiesel production and other applications: A review. **Renewable and Sustainable Energy Reviews**, v. 14, n. 1, p. 217-232, 2010.

MOSER, B. Biodiesel production, properties, and feedstocks. **In Vitro Cellular & Developmental Biology - Plant**, v. 45, n. 3, p. 229-266, 2009a.

MOSER, B. Comparative oxidative stability of fatty acid alkyl esters by accelerated methods. **Journal of the American Oil Chemists' Society**, v. 86, n. 7, p. 699-706, 2009b.

NIGAM, P. S.; SINGH, A. Production of liquid biofuels from renewable resources. **Progress in Energy and Combustion Science**, v. 37, n. 1, p. 52-68, 2011.

PEREYRA-IRUJO, G. A.; IZQUIERDO, N. G.; COVI, M.; NOLASCO, S. M.; QUIROZ, F.; AGUIRREZÁBAL, L. A. N. Variability in sunflower oil quality for biodiesel production: A simulation study. **Biomass and Bioenergy**, v. 33, n. 3, p. 459-468, 2009.

PEREZ-GARCIA, O.; ESCALANTE, F. M. E.; DE-BASHAN, L. E.; BASHAN, Y. Heterotrophic cultures of microalgae: Metabolism and potential products. **Water Research**, v. 45, n. 1, p. 11-36, 2011.

PETKOV, G.; GARCIA, G. Which are fatty acids of the green alga *Chlorella*? **Biochemical Systematics and Ecology**, v. 35, n. 5, p. 281-285, 2007.

PINZI, S.; LEIVA, D.; ARZAMENDI, G.; GANDIA, L. M.; DORADO, M. P. Multiple response optimization of vegetable oils fatty acid composition to improve biodiesel physical properties. **Bioresource Technology**, v. 102, n. 15, p. 7280-7288, 2011.

PRATAS, M. J.; S.V.D., F.; OLIVEIRA, M. B.; MONTEIRO, S. C.; LIMA, A. S.; COUTINHO, J. A. P. Biodiesel density: experimental measurements and prediction models. **Energy Fuels** v. 25, p. 2333-2340, 2011.

RAMOS, M. J.; FERNÁNDEZ, C. M.; CASAS, A.; RODRÍGUEZ, L.; PÉREZ, Á. Influence of fatty acid composition of raw materials on biodiesel properties. **Bioresource Technology**, v. 100, n. 1, p. 261-268, 2009.

STEIN, J. R. **Handbook of phycological methods. Culture methods and growth measurements**. London: Cambridge University Press, 1973. 1-448

YEH, K.-L.; CHANG, J.-S. Nitrogen starvation strategies and photobioreactor design for enhancing lipid content and lipid production of a newly isolated microalga *Chlorella vulgaris* ESP-31: Implications for biofuels. **Biotechnology Journal**, p. n/a-n/a, 2011.

ZWIETERING, M. H.; JONGENBURGER, I.; ROMBOUTS, F. M.; VAN 'T RIET, K. Modeling of the bacterial growth curve. **Appl Environ Microbiol**, v. 56, n. 6, p. 1875-81, 1990.

CAPÍTULO 6

OPTIMAL COAGULANT DOSES TO PROMOTE HIGH BIOMASS RECOVERY EFFICIENCY

Optimizing flocculation process to promote high biomass recovery efficiency

Lucy Mara Cacia Ferreira Lacerda and Telma Teixeira Franco^{*}

^{*}School of Chemical Engineering, State University of Campinas, UNICAMP, Brazil.

Highlights

1. Effect of cell concentration, pH, flocculant dosage on RE;
2. Establishment of a relationship between cell concentration and flocculant dosage;
3. Comparison of inorganic and organic flocculants recovery results;
4. Differences of inorganic and organic cell agglomerates;

Abstract

Because of the world energy crisis, global warming and restrict feedstock availability, alternative liquid fuels to petro fuel must be technically feasible, economically competitive, environmentally acceptable, and easily available. Accordingly, the viable alternative is biodiesel. Among the huge list of potential feedstocks for biodiesel production, experts agree that a future overall approach would adopt an algal-based biorefinery model to convert biomass in bioenergy (biodiesel, bioethanol, biogas and biohydrogen) as well as valuable coproducts. However, a major challenge to scale up algal-based fuels is the improvement of the processes to harvest cells that can prove to be quite challenging, because of their small cell size and their low concentration. The choice of harvesting technique depends mainly on the characteristics of the microorganism and can occur in one or more steps. In this study, flocculation followed by gravitational sedimentation was evaluated to promote *Chlorella vulgaris* harvesting using inorganic and organic flocculants. We measured the effects of algae concentration, flocculant concentration, and pH on the recovery efficiency of the algae. The results showed that is possible to use pHs between 4-11 with the organic flocculant, between 5-7 with FeCl_3 and 7-8 with $\text{Al}_2(\text{SO}_4)_3$ obtaining more than 95% of recovery efficiency with $0.08\text{g}_{\text{organic}}/\text{g}_{\text{biomass}}$, $0.34\text{g}_{\text{FeCl}_3}/\text{g}_{\text{biomass}}$ and $0.40\text{g}_{\text{Al}_2(\text{SO}_4)_3}/\text{g}_{\text{biomass}}$. Finally, the use of low amounts of organic flocculant to promote biomass harvesting in a wide range of pH, with elevated RE could be economically feasible.

Keywords: recovery efficiency, microalgae harvesting, *Chlorella*, flocculation.

1. Introduction

Liquid biofuels may offer a promising alternative to petroleum based transportation fuels. There are two global liquid transportation biofuels: bioethanol and biodiesel (DEMIRBAS, 2011). Among the huge list of potential feedstocks for biofuel production, experts agree that a future overall approach would adopt an algal-based biorefinery model to convert biomass in bioenergy (biodiesel, bioethanol, biogas and biohydrogen) as well as valuable coproducts (PIENKOS e DARZINS, 2009).

A major challenge in downstream processing of microalgae lies in the harvesting process that can be done at once or divided into different steps, each one varying depending upon the desired final total solids concentration (LEITE *et al.*, 2013). Generally, microalgae harvesting is a two stage process, involving: i) Bulk harvesting: separation of biomass from the bulk suspension using technologies as flocculation, flotation or gravity sedimentation; ii) Thickening: to concentrate the slurry through techniques such as centrifugation, filtration and ultrasonic aggregation, hence, is generally a more energy intensive step than bulk harvesting (BRENNAN e OWENDE, 2010).

The selection of harvesting technology is crucial to economic production of microalgal biomass and is dependent on characteristics of microalgae, e.g. size, density, and the value of the target products (BRENNAN e OWENDE, 2010). Flocculation is seen as a promising low-cost method that could significantly reduce cost and energy demand during harvesting process and has been widely used in freshwater and marine algae (SHEN *et al.*, 2013).

Flocculation is the process where a solute particle in a solution forms an aggregate called a floc and occurs when the solute particles collide and adhere to each other (UDUMAN, QI, DANQUAH, FORDE, *et al.*, 2010). Flocculation is a complex process and several parameters can affect the outcome including hydrodynamic conditions, temperature, pH, type and dosage of flocculant, culture age, growth medium

composition, cell concentration, their growth phase, size and surface charge (ELDRIDGE *et al.*, 2012).

Chemicals called flocculants are usually added to induce flocculation. There are two main types of flocculants: inorganic flocculants and organic polymer/polyelectrolyte flocculants (UDUMAN, QI, DANQUAH, FORDE, *et al.*, 2010). Many different chemicals have been tested for microalgal flocculation, such as: multivalent cations (e.g., alum, aluminum sulfate, ferric chloride, calcium oxide) and cationic polymers (e.g., chitosan, polyacrylamide, polyferric sulfate) (SHEN *et al.*, 2013).

The flocculants used in microalgae harvesting should be inexpensive, nontoxic, and effective in low concentration (SATYANARAYANA *et al.*, 2011). In addition, the flocculant should be selected so that further downstream processing is not adversely affected by its use (MOLINA GRIMA *et al.*, 2003; HARUN *et al.*, 2010). Ideally, optimal flocculant dosage must be used to minimize flocculation when the culture medium is recycled after the removal of the algae.

The selection of the appropriate coagulant is directly correlated to the target of the process. For example, if the purpose of coagulation is the production of pigments, then ferric salts are undesirable. If the purpose is production of biodiesel, then efficiency and economy are important, which means that selection of the fastest and cheapest coagulant is appropriate, being possible to use aluminum chloride (PAPAZI *et al.*, 2009).

Also that, a fundamental understanding of the flocculation process is critical to overcoming the economic hurdle in the large-scale production of valued products from algal feedstocks (WYATT *et al.*, 2012). In this study, we evaluate the flocculation behavior of a freshwater alga (*Chlorella vulgaris*) using three flocculant agents and measure the effects of cell concentration, flocculant concentration, and pH on the recovery efficiency of the algae.

2. Materials and Methods

2.1. Microalgae

Stock cultures of *C. vulgaris* (CPCC 90) were propagated and maintained in synthetic BBM medium (STEIN, 1973) whose composition is shown in **Table 6.1**. The incubation conditions used were 25 °C, a photon flux density of 15 $\mu\text{mol.m}^{-2}.\text{s}^{-1}$, and constant aeration by bubbling.

Table 6.1: BBM synthetic medium composition (pH 6.8).

Parameter	Value (g.L ⁻¹)	Parameter	Value (g.L ⁻¹)
Na ₂ EDTA	0.050	Fe ₂ SO ₄ .7H ₂ O	0.00498
KOH	0.0031	H ₂ SO ₄ (μL/L)	1
CaCl ₂ .2H ₂ O	0.025	H ₃ BO ₃	0.01142
MgSO ₄ .7H ₂ O	0.075	ZnSO ₄ .7H ₂ O	0.00882
K ₂ HPO ₄	0.075	MnCl ₂ .4H ₂ O	0.00144
KH ₂ PO ₄	0.175	CuSO ₄ .5H ₂ O	0.00157
NaCl	0.025	Co(NO ₃) ₂ .6H ₂ O	0.00049
NaNO ₃	0.250	MoO ₃	0.00071

2.2. Biomass production procedure

Microalgae biomass was obtained in a bubble column photobioreactor. The system was made of 4 mm thick glass and had an internal diameter of 8.0 cm, a height of 80 cm, and a nominal working volume of 3.0 L. The dispersion system for the reactor consisted of a 1.5 cm diameter air diffuser located at the center of the column. The reactor was continuously illuminated with thirty two 40 W fluorescent daylight-type tubes (General Electric, Brazil), connected in parallel and located in a photoperiod chamber. Airflow into the photobioreactor was provided via a filtered air and pure CO₂ cylinder (Praxair, Inc., Brazil) through Teflon tubing. The gas mixture was adjusted to achieve the desired concentration of carbon dioxide in the air stream through rotameters that measured the flow rates of the carbon dioxide and the air (JACOB-LOPES *et al.*, 2008).

The operational conditions of the photobioreactor were batch mode, fed with 3.0 L of BBM. The experimental conditions were as follows: an initial cell concentration of 0.1

g.L^{-1} , an isothermal reactor operating at a temperature of $26.6\text{ }^{\circ}\text{C}$, a photon flux density of $108\text{ }\mu\text{mol.m}^{-2}.\text{s}^{-1}$, and continuous aeration of 1 VVM with the injection of air containing 8.5% carbon dioxide. The cell concentration and pH were monitored every 12 h during the microbial growth phases. Biomass growth was monitored and biomass was collected after the detection of early stationary phase.

The photon flux density was determined using a digital photometer (Spectronics, model XRP3000), measuring the incident light on the external reactor surface. The temperature was controlled using thermostats and measured using a polarographic probe (Mettler Toledo, InPro5000 series). The flow rates of the carbon dioxide and air were determined using rotameters (AFSG 100 Key Instruments).

2.3. *Biomass harvesting procedure*

The flocculants investigated were $\text{Al}_2(\text{SO}_4)_3$, $\text{FeCl}_3.6\text{H}_2\text{O}$, and an organic flocculant. Inorganic flocculants were obtained from Ecibra (Brazil) and organic flocculant from PETROBRAS. The concentration of the stock inorganic and organic flocculant solutions used was 10 and 1 g.L^{-1} , respectively. Experimental conditions tested are described in **Table 6.2**.

Harvesting experiments were carried out in a Jar-Test (Nova Ética, Model 218/LDB06) with six 1 liter jar tester with variable speed mixer (**Figure 6.1**). Biomass collected in early stationary phase was direct used in harvesting experiments. The effects of pH, flocculant dose and cell concentration were investigated by adjusting the pH with 5 M hydrochloric acid or sodium hydroxide, when necessary.

Before start the experiments, samples of the solution were pipette from a fixed height in the jar corresponding to a volume of 0.8 L and analyzed in terms of pH and cell concentration. Desired dose of the flocculant was added into the microalgae solution. The mixture was agitated at 200 rpm for 2 min (fast mix) followed by a slow mix for 15 min at 50, 30 and 20 rpm (5 min each). It was then left to settle for 60 min and pictures were taken to analyze sedimentation rate. After this period, samples of the solution were

pipette from a fixed height in the jar corresponding to a volume of 0.8 L and in the bottom. Samples from top were analyzed in terms of pH and cell concentration, and samples from bottom were analyzed in terms of formed flocs.

Table 6.2: Biomass harvesting experimental conditions.

Flocculant	Experiment description
$\text{Al}_2(\text{SO}_4)_3$	4 pH (5.0; 7.0; 7.4; 8.0) with $0.5 \text{ g}_{\text{Biomass}} \cdot \text{L}^{-1}$ and $0.2 \text{ g}_{\text{Al}_2(\text{SO}_4)_3} \cdot \text{L}^{-1}$
	5 flocculant doses (0.10; 0.15; 0.20; 0.25; $0.30 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$) with pH 7.0 and $0.5 \text{ g}_{\text{Biomass}} \cdot \text{L}^{-1}$
	5 biomass concentrations (0.1; 0.3; 0.5; 0.7; $1.0 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$) with pH 7.0 and $0.20 \text{ g}_{\text{Al}_2(\text{SO}_4)_3} \cdot \text{L}^{-1}$
FeCl_3	4 pH (5.0; 7.0; 9.0; 11.0) with $0.5 \text{ g}_{\text{Biomass}} \cdot \text{L}^{-1}$ and $0.2 \text{ g}_{\text{FeCl}_3} \cdot \text{L}^{-1}$
	5 flocculant doses (0.10; 0.14; 0.17; 0.20; $0.30 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$) with pH 7.0 and $0.5 \text{ g}_{\text{Biomass}} \cdot \text{L}^{-1}$
	5 biomass concentrations (0.1; 0.3; 0.5; 0.7; $1.0 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$) with pH 7.0 and $0.17 \text{ g}_{\text{FeCl}_3} \cdot \text{L}^{-1}$
Organic flocculant	4 pH (4.0; 7.0; 9.0; 11.0) with $0.5 \text{ g}_{\text{Biomass}} \cdot \text{L}^{-1}$ and $0.2 \text{ g}_{\text{Organic}} \cdot \text{L}^{-1}$
	5 flocculant doses (0.005; 0.010; 0.015; 0.020; $0.040 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$) with pH 7.0 and $0.5 \text{ g}_{\text{Biomass}} \cdot \text{L}^{-1}$
	5 biomass concentrations (0.1; 0.3; 0.5; 0.7; $1.0 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$) with pH 7.0 $0.04 \text{ g}_{\text{organic}}/\text{g}_{\text{Biomass}}$

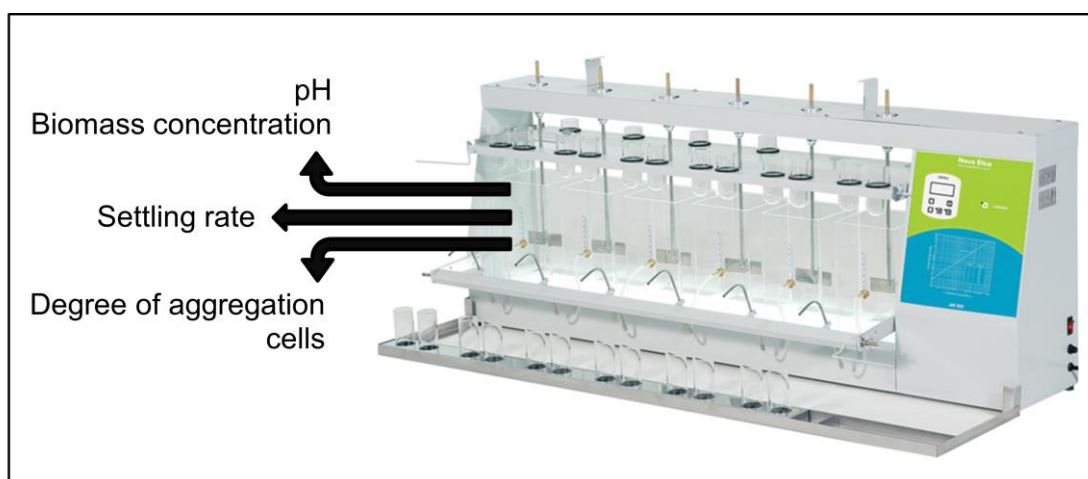


Figure 6.1: Jar test with details of the analysis points.

2.4. Data analysis

Cell concentration was evaluated gravimetrically by filtering a known volume of culture medium through a 0.22 µm filter (Millipore) and drying at 60 °C for 24 hours. The pH was measured by a potentiometer (Hanna, model 8417). Degree of aggregation of cells was analyzed using a microscope (Bel- Model BioVideo) with magnification of 4 and 100 times. Pictures were registered with a 6 MP digital camera (Tron - Model Digitron Z6s).

The effectiveness of flocculation was determined by the recovery efficiency during microalgal separation. Recovery efficiency (RE) is defined as the ratio of the mass of cells recovered to the total mass of cells and is determined as (PAPAZI *et al.*, 2009):

$$RE (\%) = \frac{X_{(t_0)} - X_{(t)}}{X_{(t_0)}} 100 \quad (6.1)$$

3. Results and Discussion

The efficiency of flocculation is determined by the probability of collision of the flocculant agent and microalgal particles, as well as the capability of these particles to stick together once brought together by collision (UDUMAN, QI, DANQUAH e HOADLEY, 2010).

C. vulgaris cultures were harvested using different flocculation agents to evaluate the effect of flocculant type, pH, flocculant doses and cell concentration. Natural sedimentation of *C. vulgaris* was evaluated, but in the period analyzed (60 min) the results were not significant.

Figure 6.2 present *C. vulgaris* before pH corrections and flocculant agent addition and can represent the beginning of the all tests realized. Is possible visualize isolated cells, without agglomerate formations.

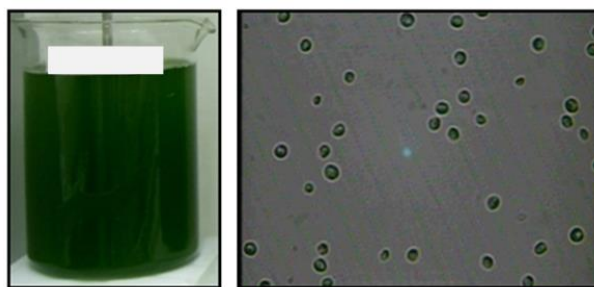


Figure 6.2: Images representing the beginning of the tests before pH correction and flocculant addition.

3.1. *Effect of pH*

Effect of pH needs to be established because pH influences the charge of microalgal cell surface and flocculants can only function over a certain pH range. An optimal pH can result in minimum dosage of flocculant use, being an important parameter to consider. In this sense, different pHs for each flocculant were tested in 1 liter cultures with 0.5 g.L^{-1} of biomass and 0.2 g.L^{-1} of flocculant agent.

The addition of inorganic flocculants results in a decrease in the solution pH as (**Figure 6.3**): i) the Fe ions of FeCl_3 combine with hydroxide groups in solution to form $\text{Fe}(\text{OH})_3$. There is a small amount of HCl added to the FeCl_3 solution by the manufacturer to enhance product stability that also contributes to the change in pH (WYATT *et al.*, 2012), and ii) the Al ions of $\text{Al}_2(\text{SO}_4)_3$ combine with hydroxide groups in solution to form $\text{Al}(\text{OH})_3$. Is important to say that the solution pH was not adjusted beyond the changes induced by FeCl_3 or $\text{Al}_2(\text{SO}_4)_3$ addition.

Recovery efficiency of each case tested is presented in **Figure 6.4**. It was possible to select the following pH ranges to obtain $\text{RE} > 95\%$: i) 4.0 to 11.0 using organic flocculant; ii) 5.0 to 7.0 with FeCl_3 ; and iii) 7.0 to 8.0 for $\text{Al}_2(\text{SO}_4)_3$. When pH values out of these ranges is used, RE decreases drastically indicating that the process was insufficient to surface charge destabilization and floc formation.

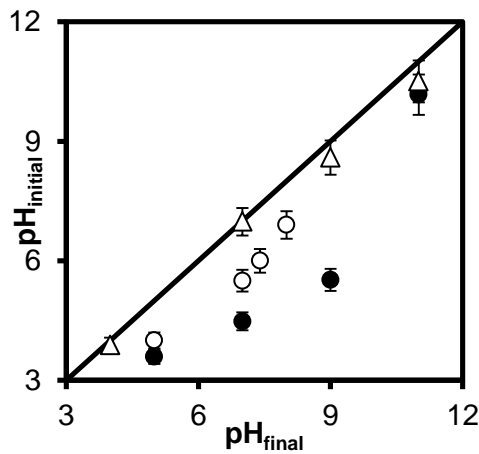


Figure 6.3: Effect of flocculant addition in solution pH.
(‘●’ FeCl_3 ; ‘○’ $\text{Al}_2(\text{SO}_4)_3$; ‘Δ’ organic)

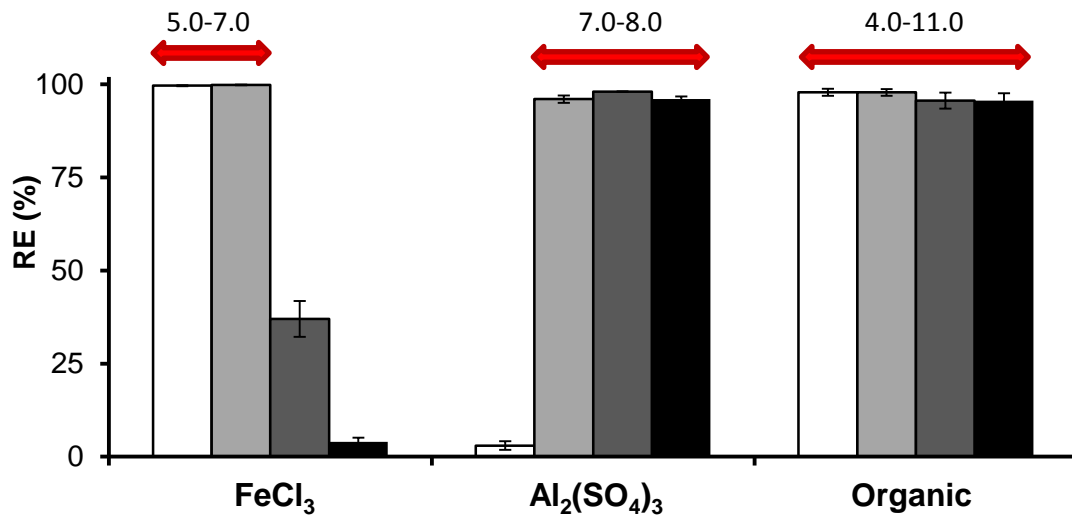


Figure 6.4: Effect of pH in the recovery efficiency.
[left to right: FeCl_3 (pH 5.0; 7.0; 9.0; 11.0); $\text{Al}_2(\text{SO}_4)_3$ (pH 5.0; 7.0; 7.4; 8.0); Organic (pH 4.0; 7.0; 9.0; 11.0)]

3.2. Effect of flocculant doses

Optimum dosage is the maximum amount of flocculant that the solid can utilize for flocculation under the conditions of the experiment and is directly related to the amount of particle adsorption. In this sense, different dosages of each flocculant were tested in 1 liter cultures with pH 7.0 and 0.5 g.L^{-1} of biomass.

The solution pH were continuously decreased with the increase of inorganic flocculant dosage (**Figure 6.5**), but the solution pH was not adjusted beyond the changes induced by FeCl_3 or $\text{Al}_2(\text{SO}_4)_3$ addition. Recovery efficiency of the tests is presented in **Figure 6.6**. It was possible to select the following flocculant dosages to obtain $\text{RE} > 95\%$: i) 0.04 g.L^{-1} of organic flocculant ($0.08 \text{ g}_{\text{organic}}/\text{g}_{\text{biomass}}$); ii) 0.17 g.L^{-1} of FeCl_3 ($0.34 \text{ g}_{\text{FeCl}_3}/\text{g}_{\text{biomass}}$); and iii) 0.20 g.L^{-1} of Al_2SO_4 ($0.40 \text{ g}_{\text{Al}_2\text{SO}_4}/\text{g}_{\text{biomass}}$).

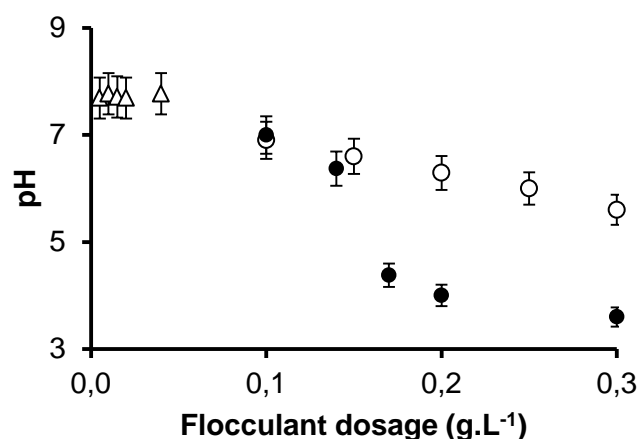


Figure 6.5: Effect of flocculant dosage in solution pH.
(‘●’ FeCl_3 ; ‘○’ $\text{Al}_2(\text{SO}_4)_3$; ‘Δ’ organic)

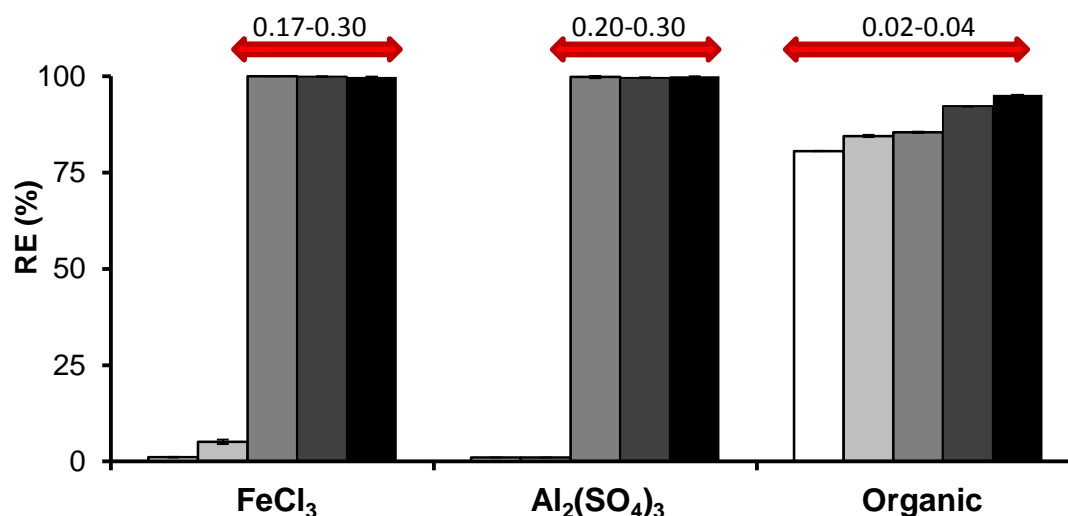


Figure 6.6: Effect of flocculant dosage (g.L^{-1}) in the recovery efficiency.
[left to right: FeCl_3 (0.10; 0.14; 0.17; 0.20; 0.30 g.L^{-1}); $\text{Al}_2(\text{SO}_4)_3$ (0.10; 0.15; 0.20; 0.25; 0.30 g.L^{-1}); Organic (0.005; 0.010; 0.015; 0.020; 0.040 g.L^{-1})]

3.3. Effect of cell concentration

The concentration of the cells is a very important parameter for the determination of the optimal dose of culture cell coagulants (PAPAZI *et al.*, 2009). For organic flocculants, the main strategy is to establish a linear relationship between cell concentration and flocculant dosage (VANDAMME *et al.*, 2009). For inorganic flocculants this strategy may not be effective in wide ranges of cell concentration (KIM *et al.*, 2011).

In this sense, different cell concentrations were tested in 1 liter cultures with pH 7.0 and $0.08 \text{ g}_{\text{organic}}/\text{g}_{\text{biomass}}$; $0.17 \text{ g}_{\text{FeCl}_3}/\text{L}$; or $0.20 \text{ g}_{\text{Al}_2\text{SO}_4}/\text{L}$. It was decided to vary the cell concentration at constant concentration of the inorganic flocculant, to be able to evaluate the effects of flocculant limiting or excess. Results were presented in **Figure 6.7**. Comparing the effects of flocculant dosage and cell concentration was possible to observe that:

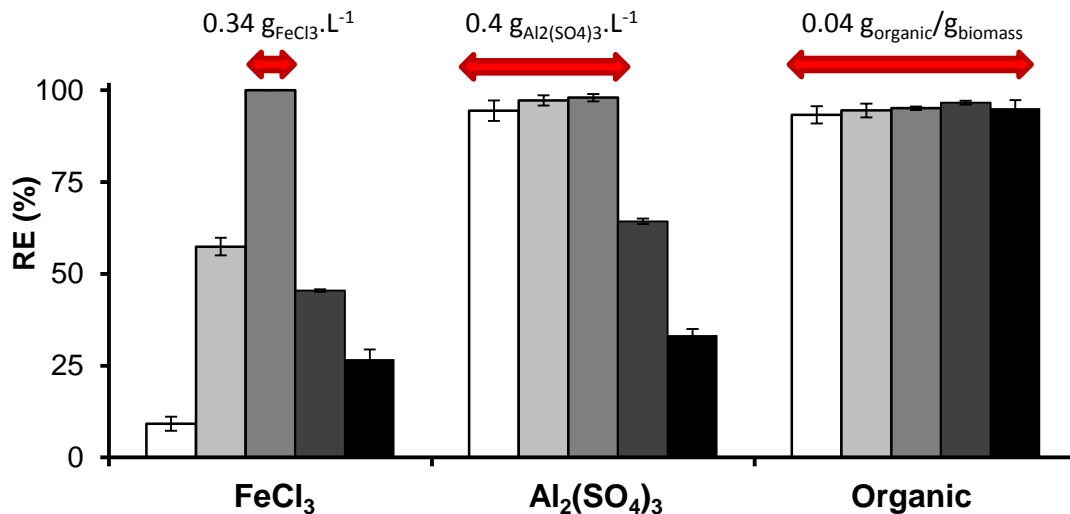


Figure 6.7: Effect of cell concentration in the recovery efficiency.
[left to right: FeCl₃ (0.1; 0.3; 0.5; 0.7; 1.0 g.L⁻¹); Al₂(SO₄)₃ (0.1; 0.3; 0.5; 0.7; 1.0 g.L⁻¹); Organic (0.1; 0.3; 0.5; 0.7; 1.0 g.L⁻¹)]

Flocculation with FeCl_3 is ineffective at low concentrations ($< 0.2 \text{ g}_{\text{FeCl}_3}/\text{g}_{\text{biomass}}$). There is a region of flocculation efficiency increase until 100% at moderate FeCl_3 concentrations (0.2 to $0.34 \text{ g}_{\text{FeCl}_3}/\text{g}_{\text{biomass}}$). At higher FeCl_3 concentrations ($> 0.34 \text{ g}_{\text{FeCl}_3}/\text{g}_{\text{biomass}}$) occurs changes in the color of the culture to brown and flocculation again can becomes ineffective if the solution pH was uniformly below 3.8.

Flocculation with $\text{Al}_2(\text{SO}_4)_3$ is ineffective at low concentrations ($< 0.2 \text{ g}_{\text{Al}_2(\text{SO}_4)_3}/\text{g}_{\text{biomass}}$). Flocculation efficiency increase until 100% at moderate $\text{Al}_2(\text{SO}_4)_3$ concentrations (0.2 to $0.40 \text{ g}_{\text{Al}_2(\text{SO}_4)_3}/\text{g}_{\text{biomass}}$). High $\text{Al}_2(\text{SO}_4)_3$ concentrations ($> 0.40 \text{ g}_{\text{Al}_2(\text{SO}_4)_3}/\text{g}_{\text{biomass}}$) will not affect flocculation efficiency.

Flocculation with organic agent is effective at low concentrations ($< 0.01 \text{ g}_{\text{organic}}/\text{g}_{\text{biomass}}$). There is a region of flocculation efficiency increase until 100% at moderate organic flocculant concentrations (0.01 to $0.08 \text{ g}_{\text{organic}}/\text{g}_{\text{biomass}}$). Higher concentrations ($> 0.08 \text{ g}_{\text{FeCl}_3}/\text{g}_{\text{biomass}}$) will not affect flocculation efficiency.

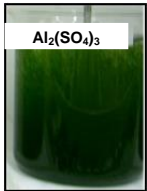
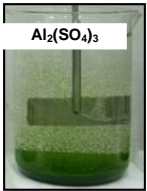
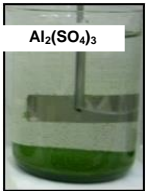
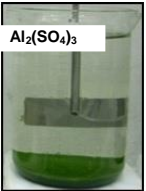
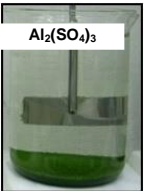
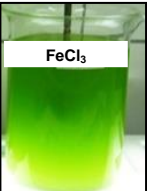
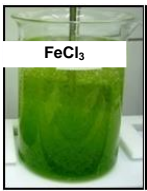
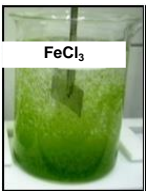
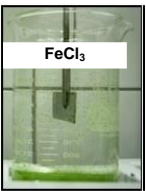
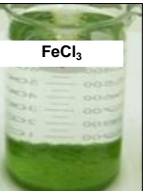
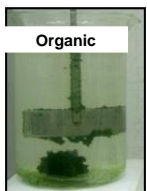


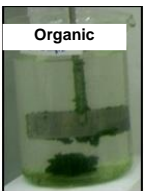
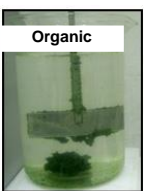
3.4. General observations

Table 6.3 contains pictures taken during sedimentation period for each flocculant agent and in the best conditions (pH 7.0 and $0.08 \text{ g}_{\text{organic}}/\text{g}_{\text{biomass}}$ or $0.34 \text{ g}_{\text{FeCl}_3}/\text{g}_{\text{biomass}}$ or $0.40 \text{ g}_{\text{Al}_2\text{SO}_4}/\text{g}_{\text{biomass}}$).

With jar tests, the supernatant of the treated sample was collected to measure the residual cell concentration for evaluating the coagulation efficiency. Physical characteristics of the floc was evaluated because can be more influential because large compact flocs have a high settling rate, whilst large and porous flocs aid filtration due to high permeability (CHENG *et al.*, 2008). In this sense, mainly conclusions of this study were described below:

- ✓ The results from the jar tests show that all the flocculants investigated can flocculate the microalgal cells to some extent and hence improve the separation rate of the microalgal cells from the culture.
- ✓ Flocculation occurs when two conditions were met: the pH was between of a determined range value and sufficient quantity of flocculant was present.

Table 6.3: Sedimentation images using flocculant best conditions.

Flocculant	Sedimentation time (min)				
	0	2	5	10	30
$\text{Al}_2(\text{SO}_4)_3$					
FeCl_3					
Organic					

- ✓ After addition of the appropriate quantity of each flocculant agent, formation of cell aggregates was immediately observed.
- ✓ At the end of slow mixing time, flocs with organic flocculant were already formed and sedimented.
- ✓ Flocculation time when using organic flocculant was 10 and 30 times shorter, respectively, than what was the case for $\text{Al}_2(\text{SO}_4)_3$ and FeCl_3 .
- ✓ Cell aggregates formed with organic flocculant adhered to the stainless steel (impeller). This problem was not observed with $\text{Al}_2(\text{SO}_4)_3$ or FeCl_3 flocculants.
- ✓ During the experiments, two main types of flocs were observed (**Figure 6.8**), with one type darker and denser than the other. Same results were observed by in experiments with others flocculant agents (LEE *et al.*, 2009).
- ✓ Organic flocculant forms a dense floc with a large number of microalgal cells embedded and with relatively few microalgae cells left in the surrounding media.
- ✓ Inorganic flocculants ($\text{Al}_2(\text{SO}_4)_3$ or FeCl_3) shows a much looser floc with a large amount of inorganic flocculants but with very few microalgal cells attached (some

microalgal cells appeared to be attached but were in fact positioned under the floc and then compressed by the glass slide).

- ✓ An over dose of the flocculants can re-stabilize dispersions by a reversal of the charge of the colloidal particles (AMUDA e AMOO, 2007) or can just change the color of the culture to brown as happen with excess of FeCl_3 (PAPAZI *et al.*, 2009). In the conditions tested, use high dose of FeCl_3 change the color of the culture to brown as shown in **Figure 6.9**.

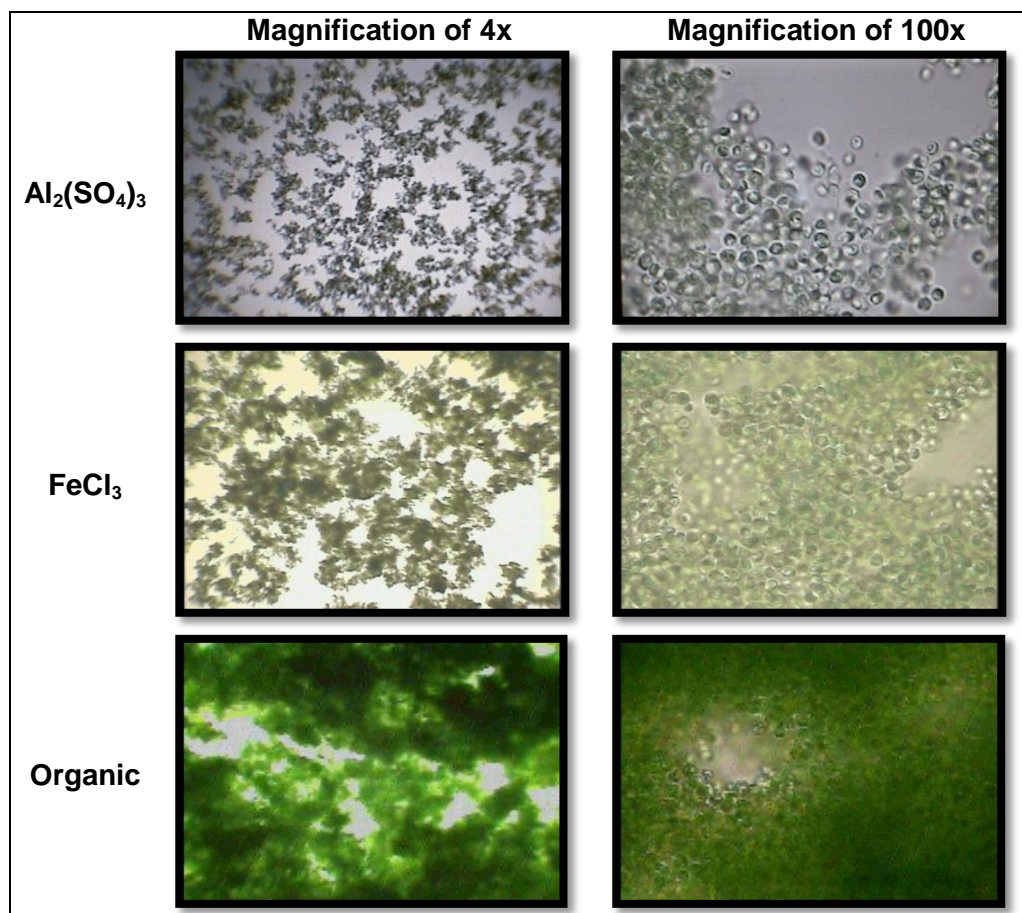


Figure 6.8: Different flocs formed with the flocculant agents.

- ✓ Generally, ferric flocculants are more effective agents, than the aluminum ones (NTAMPOU *et al.*, 2006), but in this study, was observed better results using $\text{Al}_2(\text{SO}_4)_3$.

- ✓ The organic flocculant was found to be the most effective, with the lowest optimum dose ($0.08 \text{g}_{\text{organic_flocculant}}/\text{g}_{\text{biomass}}$) and it is the only one that doesn't need a pH culture medium correction.

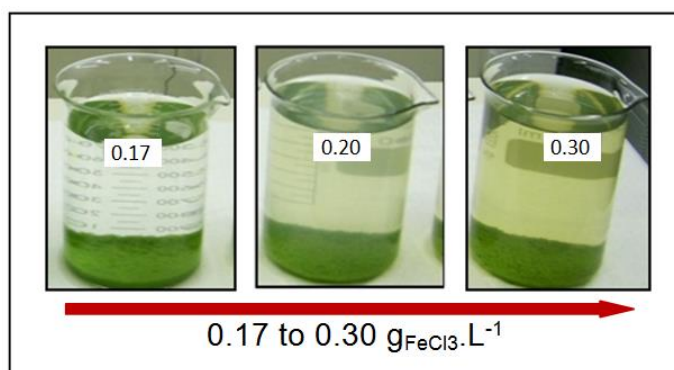


Figure 6.9: Change in the color of culture with excess of FeCl_3 .

4. Conclusions

In this study, flocculation followed by gravitational sedimentation was evaluated to promote *C. vulgaris* harvesting. We measure the effects of cell concentration, flocculant dosage, and pH on the RE of the algae. The results showed that is possible to use pHs between 4-11 with the organic flocculant, between 5-7 with FeCl_3 and 7-8 to $\text{Al}_2(\text{SO}_4)_3$ obtaining $\text{RE} > 95\%$ with $0.08 \text{g}_{\text{org_coag}}/\text{g}_{\text{biomass}}$, $0.34 \text{g}_{\text{FeCl}_3}/\text{g}_{\text{biomass}}$ and $0.40 \text{g}_{\text{Al}_2(\text{SO}_4)_3}/\text{g}_{\text{biomass}}$. This work contributes to improving the dewatering of *C. vulgaris* cultures by developing an optimum flocculation process using organic or inorganic flocculants.

5. Acknowledgments

Funding for this research was provided by the Fundação de Amparo a Pesquisa no Estado de São Paulo, FAPESP (Brazil); Capes; CNPQ and PETROBRAS.

6. References

- AMUDA, O. S.; AMOO, I. A. Coagulation/flocculation process and sludge conditioning in beverage industrial wastewater treatment. **Journal of Hazardous Materials**, v. 141, n. 3, p. 778-783, 2007.
- BRENNAN, L.; OWENDE, P. Biofuels from microalgae--A review of technologies for production, processing, and extractions of biofuels and co-products. **Renewable and Sustainable Energy Reviews**, v. 14, n. 2, p. 557-577, 2010.
- CHENG, W. P.; KAO, Y. P.; YU, R. F. A novel method for on-line evaluation of floc size in coagulation process. **Water Res**, v. 42, n. 10-11, p. 2691-7, 2008.
- DEMIRBAS, M. F. Biofuels from algae for sustainable development. **Applied Energy**, v. 88, n. 10, p. 3473-3480, 2011.
- ELDRIDGE, R. J.; HILL, D. R. A.; GLADMAN, B. R. A comparative study of the coagulation behaviour of marine microalgae. **Journal of Applied Phycology**, v. 24, n. 6, p. 1667-1679, 2012.
- HARUN, R.; SINGH, M.; FORDE, G. M.; DANQUAH, M. K. Bioprocess engineering of microalgae to produce a variety of consumer products. **Renewable and Sustainable Energy Reviews**, v. 14, n. 3, p. 1037-1047, 2010.
- JACOB-LOPES, E.; LACERDA, L. M. C. F.; FRANCO, T. T. Biomass production and carbon dioxide fixation by *Aphanothece microscopica Nägeli* in a bubble column photobioreactor. **Biochemical Engineering Journal**, v. 40, n. 1, p. 27-34, 2008.
- KIM, D.-G.; LA, H.-J.; AHN, C.-Y.; PARK, Y.-H.; OH, H.-M. Harvest of *Scenedesmus* sp. with bioflocculant and reuse of culture medium for subsequent high-density cultures. **Bioresource Technology**, v. 102, n. 3, p. 3163-3168, 2011.
- LEE, A. K.; LEWIS, D. M.; ASHMAN, P. J. Microbial flocculation, a potentially low-cost harvesting technique for marine microalgae for the production of biodiesel. **Journal of Applied Phycology**, v. 21, n. 5, p. 559-567, 2009.
- LEITE, G. B.; ABDELAZIZ, A. E. M.; HALLENBECK, P. C. Algal biofuels: Challenges and opportunities. **Bioresource Technology**, n. 0, 2013.
- MOLINA GRIMA, E.; BELARBI, E. H.; ACIÉN FERNÁNDEZ, F. G.; ROBLES MEDINA, A.; CHISTI, Y. Recovery of microalgal biomass and metabolites: process options and economics. **Biotechnology Advances**, v. 20, n. 7-8, p. 491-515, 2003.

NTAMPOU, X.; ZOUBOULIS, A. I.; SAMARAS, P. Appropriate combination of physico-chemical methods (coagulation/flocculation and ozonation) for the efficient treatment of landfill leachates. **Chemosphere**, v. 62, n. 5, p. 722-30, 2006.

PAPAZI, A.; MAKRIDIS, P.; DIVANACH, P. Harvesting *Chlorella minutissima* using cell coagulants. **Journal of Applied Phycology**, v. 22, n. 3, p. 349-355, 2009.

PIENKOS, P. T.; DARZINS, A. The promise and challenges of microalgal-derived biofuels. **Biofuels, Bioproducts and Biorefining**, v. 3, n. 4, p. 431-440, 2009.

SATYANARAYANA, K. G.; MARIANO, A. B.; VARGAS, J. V. C. A review on microalgae, a versatile source for sustainable energy and materials. **International Journal of Energy Research**, v. 35, n. 4, p. 291-311, 2011.

SHEN, Y.; CUI, Y.; YUAN, W. Flocculation Optimization of Microalga *Nannochloropsis oculata*. **Applied Biochemistry and Biotechnology**, v. 169, n. 7, p. 2049-2063, 2013.

STEIN, J. R. **Handbook of phycological methods. Culture methods and growth measurements**. London: Cambridge University Press, 1973. 1-448

UDUMAN, N.; QI, Y.; DANQUAH, M. K.; FORDE, G. M.; HOADLEY, A. Dewatering of microalgal cultures: A major bottleneck to algae-based fuels. **Journal of Renewable and Sustainable Energy**, v. 2, n. 1, p. 012701, 2010.

UDUMAN, N.; QI, Y.; DANQUAH, M. K.; HOADLEY, A. F. A. Marine microalgae flocculation and focused beam reflectance measurement. **Chemical Engineering Journal**, v. 162, n. 3, p. 935-940, 2010.

VANDAMME, D.; FOUBERT, I.; MEESSCHAERT, B.; MUYLAERT, K. Flocculation of microalgae using cationic starch. **Journal of Applied Phycology**, v. 22, n. 4, p. 525-530, 2009.

WYATT, N. B.; GLOE, L. M.; BRADY, P. V.; HEWSON, J. C.; GRILLET, A. M.; HANKINS, M. G.; POHL, P. I. Critical conditions for ferric chloride-induced flocculation of freshwater algae. **Biotechnology and Bioengineering**, v. 109, n. 2, p. 493-501, 2012.

CAPÍTULO 7

IMPACT OF LIGHT AVAILABILITY IN MICROALGAE CULTURES

Impact of light availability in cell microalgae cultures

Lucy Mara Cacia Ferreira Lacerda and Telma Teixeira Franco^{*}

^{*} School of Chemical Engineering, State University of Campinas, UNICAMP, Brazil.

Highlights

1. Effect of light intensity on biomass growth and lipid accumulation;
2. Light distribution inside of photobioreactors;
3. Loss of light intensity availability with cell growth;
4. Change in pigment content as function of light availability;

Abstract

Microalgae are sunlight-driven cell factories that convert carbon dioxide and water into biomass that can be used, after proper treatment, in biofuels production (biodiesel, ethanol, methanol and hydrogen) and proteins, pigments, enzymes, and bioactive molecules recovery. Light intensity availability and distribution are the major factor that limits microalgae growth and productivity in photobioreactors. In this work, cultures of *Chlorella vulgaris* in bubble columns photobioreactors were carried out under different light intensities (108, 420 and 700 $\mu\text{mol.m}^{-2}.\text{s}^{-1}$) to evaluate biomass growth and productivity, pigment content, light intensity distribution, lipid accumulation and biodiesel quality. In less than 24 hours after inoculation, light intensity of 700 $\mu\text{mol.m}^{-2}.\text{s}^{-1}$ resulted in complete cell death. Using 108 and 420 $\mu\text{mol.m}^{-2}.\text{s}^{-1}$, respectively, following results were obtained: $X_{\text{max}} = 1.6$ and 1.00 g.L^{-1} , $\mu_{\text{max}} = 1.02$ and 2.0 d^{-1} , $\lambda = 0.5$ and 1.2 d , $P_{\text{max}} = 0.58$ and $0.65 \text{ g.L}^{-1}.\text{d}^{-1}$, $C_a = 0.27$ and $0.04 \mu\text{g/mg}$, $C_b = 0.11$ and $0.08 \mu\text{g/mg}$, $C_{(C+X)} = 0.13$ and $0.03 \mu\text{g/mg}$, 50 and 44% of lipid content, SFA = 32 and 25%, MUFA = 42 and 45%, PUFA = 26 and 28%, CN = 56 and 53. In both cases, after 96 h the cell cultures showed concentrations below 2 g.L^{-1} and less than 10 and 14% of light incident available inside of the reactor, suggesting that the implications of this work are very significant to microalgae culture, carbon dioxide mitigation, photobioreactor design, and efforts needs to be employed to viable photosynthetic microalgae cultures.

Keywords: bubble column, light distribution, photosynthetic cultures, microalgae.

1. Introduction

Because of the world energy crisis, global warming and feedstock availability, an alternative fuel to petro fuel must be technically feasible, economically competitive, environmentally acceptable and easily available. In recent years microalgae are considered a promising material for the production of biofuels, medicine and food (KIM *et al.*, 2013), but in order to make microalgae production feasible, improvements in terms of isolation/characterization of microalgae species, microalgae mass cultivation, harvesting, and post-processing need to be addressed .

Microalgae are a microscopic photosynthetic, free living organisms of several microns than can grow in a wide range of environments , efficiently use CO₂, produce biomass very rapidly and accumulate energy-rich oils (MATA *et al.*, 2010). We can also describe microalgae as a sunlight-driven cell factories that convert carbon dioxide and water into biomass containing lipids, proteins and carbohydrates (BANNISTER, 1979).

Microalgae mass cultivation use far less land than conventional crops, no have competition for land space that could be used for food crops (MATA *et al.*, 2010), and can be associated with biofuel production (biodiesel, biogas, ethanol and hydrogen), CO₂ mitigation from flue gas and wastewater treatment (MUÑOZ e GUIEYSSE, 2006).

Light, temperature, nutrient quality and quantity, pH, salinity and mixing are the most important parameters regulating algal growth (BARSANTI e GUALTIERI, 2006) and need to be optimized to improve microalgae mass cultivation. Open ponds (raceways, circular ponds, rectangular ponds) and photobioreactors (bubble columns, airlift, flat plate) are the common growth systems used in microalgae mass cultivation, but both systems has tradeoffs between the key design parameters. The full understanding of these would help the development of photobioreactors.

Microalgae growth only when the light intensity is higher than the light compensation point. Increasing light beyond the compensation point results in an

increase in the growth rate until the culture becomes light saturated (light saturation point), and higher light intensities can lead to photoinhibition (ANDERSEN, 2005). In this sense, light (intensity, wavelength, distribution and frequency) is the major factor that limits the photobioreactors efficiency where highly inhomogeneous light distribution occurs, because cells are exposed to high light intensities close to reactor walls while central parts are dark. This greatly reduces their light use efficiency (ERIKSEN, 2008).

The light regimen itself is influenced by incident light intensity (light available), reactor design and dimension (light path), cell density (light scattering by cells), pigmentation of the cells (culture color), mixing pattern (introduction of air bubbles can increase the light penetration depth), liquid circulation time (light/dark cycle), and more (ERIKSEN, 2008).

Several empirical models have been developed to predict light availability inside of photobioreactors, but the most complete take into account the absorption of light by pigments, the geometry of the reactor, the light source, and scattering of light by cells and other particles, and (ACIÉN FERNÁNDEZ *et al.*, 1999; BERBEROGLU *et al.*, 2007; ERIKSEN, 2008).

In this work, cultures of *Chlorella vulgaris* in photobioreactors were carried out under different light intensities to evaluate biomass growth and productivity, pigment content, light intensity distribution, lipid accumulation and biodiesel quality.

2. Materials and Methods

2.1. Microalgae

Stock cultures of *C. vulgaris* (CPCC 90) were propagated and maintained in synthetic BBM medium (STEIN, 1973) whose composition is shown in **Table 7.1**. The incubation conditions used were 25 °C, a photon flux density of 15 $\mu\text{mol.m}^{-2}.\text{s}^{-1}$, and constant aeration by bubbling.

Table 7.1: BBM synthetic medium composition (pH 6.8).

Parameter	Value (g.L ⁻¹)	Parameter	Value (g.L ⁻¹)
Na ₂ EDTA	0.050	Fe ₂ SO ₄ .7H ₂ O	0.00498
KOH	0.0031	H ₂ SO ₄ (μL/L)	1
CaCl ₂ .2H ₂ O	0.025	H ₃ BO ₃	0.01142
MgSO ₄ .7H ₂ O	0.075	ZnSO ₄ .7H ₂ O	0.00882
K ₂ HPO ₄	0.075	MnCl ₂ .4H ₂ O	0.00144
KH ₂ PO ₄	0.175	CuSO ₄ .5H ₂ O	0.00157
NaCl	0.025	Co(NO ₃) ₂ .6H ₂ O	0.00049
NaNO ₃	0.250	MoO ₃	0.00071

2.2. Culture system

The experiments were carried out in a bubble column photobioreactor. The system was made of 4 mm thick glass and had an internal diameter of 8.0 cm, a height of 80 cm, and a nominal working volume of 3.0 L. The dispersion system for the reactor consisted of a 1.5 cm diameter air diffuser located at the center of the column. The reactor was continuously illuminated with thirty two 40 W fluorescent daylight-type tubes (General Electric, Brazil), connected in parallel and located in a photoperiod chamber. Airflow into the photobioreactor was provided via a filtered air and pure CO₂ cylinder (Praxair, Inc., Brazil) through Teflon tubing. The gas mixture was adjusted to achieve the desired concentration of carbon dioxide in the air stream through rotameters that measured the flow rates of the carbon dioxide and the air (JACOB-LOPES *et al.*, 2008).

2.3. Operational conditions

The operational conditions of the photobioreactor were batch mode, fed with 3.0 L of BBM. The experimental conditions were as follows: an initial cell concentration of 0.1 g.L⁻¹, an isothermal reactor operating at a temperature of 26.6 °C, a photon flux density of 108, 420 or 700 μmol.m⁻².s⁻¹, and continuous aeration of 1 VVM with the injection of air containing 8.5% carbon dioxide. The cell concentration and pH were monitored every 12 h during the microbial growth phases. Residence times of up to 96h were adopted for

the experiments. The tests were carried out in duplicate and the kinetic data refers to the mean of four repetitions.

The photon flux density was determined using a digital photometer (Spectronics, model XRP3000), measuring the incident light on the external reactor surface. The temperature was controlled using thermostats and measured using a polarographic probe (Mettler Toledo, InPro5000 series). The flow rates of the carbon dioxide and air were determined using rotameters (AFSG 100 Key Instruments).

2.4. Analytical methods

Cell concentration was evaluated gravimetrically by filtering a known volume of culture medium through a 0.22 μm filter and drying at 60 °C for 24 hours. The pH dynamics during cultivation were measured by a potentiometer (Hanna, model 8417).

The extraction of pigments from the filters was carried out in 90% aqueous acetone (v/v). To each filter aqueous acetone was added and mixed for 5 min. After vortex mixing, each sample was refrigerated at 8 °C for 24 h, centrifuged for 20 min at 6700 g. The supernatant was collected in a brown graduated 10 mL flask. This was followed by photometric quantification (digital spectrophotometer UV-Vis, Genesys-10 UV) of pigments concentration (SCHUMANN *et al.*, 2005).

Early stationary phase cells were harvested by centrifugation at 8000 g for 10 min (Hettich Model Rotina 420), frozen at -80 °C (So-Low Ultra freezer Model PV 85-13), and freeze-dried at -30 °C and 50 mHg (Liobras-Model L101) for lipid analysis. The amount of lipid was determined using 400 mg of lyophilized biomass digested by 5 mL of HCl 2 mol.L⁻¹ at 80 °C during 1h. The extraction process started with the centrifugation (500 g for 2 min) of the digested biomass. Then the supernatant was removed and the pellet mixed with 4 mL of methanol, 2 mL of chloroform, and 3.6 mL of distilled water, followed by agitation (2 min) and centrifugation (500 g for 2 min). The lower phase was transferred to a test tube. Re-extraction was carried out in upper phase by addition of 4 mL of a 10% v/v methanol:chloroform solution, followed by agitation and centrifugation

(500 g for 2 min). The lower phase was added to the test tube and the chloroform removed at 75 °C (BLIGH e DYER, 1959).

Direct transesterification was carried out using 20 mg of lyophilized biomass. Three mL of methanol:hydrochloric acid:chloroform mixture (10:1:1) was added to the sample, agitated, and left at 90 °C for 1 h. The samples were cooled to room temperature and 2 mL of a 4:1 hexane:chloroform mixture was added, agitated for 2 min, and centrifuged. The upper phase was removed and the process was repeated twice (LEWIS *et al.*, 2000).

The FA profile was analyzed using a Varian Star 3600 CX gas chromatograph system with a flame ionization detector (FID) and a J & W Scientific DB-23 column, 30 m x 0.53 mm. Helium was used as the mobile phase (15 psi, split 1/100) at temperatures of 250 °C in the injector and 300 °C in the detector. The temperature ramp for the column was as follows: an initial temperature of 50 °C for 2 min, a gradient of 10 °C/min from 50 °C to 180 °C with a standby time of 5 min, and a gradient of 5 °C/min from 180 °C to 240 °C, totaling 32 min of chromatographic run. The injection volume was 1 µL. A standard Supelco 37 Component FAME Mix (10mg.mL⁻¹ in CH₂Cl₂ (47885-U) containing methyl esters ranging from C4:0 to C24:1 was used to identify the retention time for FAME peak integration.

Furthermore, the FAs were identified by a Shimadzu GC-2010 Plus with MS detector and a Stabilwax capillary column, 30 m x 0.25 mm I.D., 0.25 µm. The electron ionization energy was 70 eV. Helium was used as the mobile phase (15 psi, split 1/50) at temperatures of 250 °C in the injector and 300 °C in the detector. The temperature programming for the column was 50 °C for 2 min, a gradient of 10 °C/min from 50 °C to 180 °C with a standby time of 5 min, and a gradient of 5 °C/min from 180 °C to 240 °C, totaling 32 min of chromatographic run. The injection volume was 1 µL. GC-MS solution software (Shimadzu, Kyoto, Japan) was used for GC-MS analysis and the libraries used for comparison were Nist08 and Nist08s.

2.5. Data analysis

2.5.1. Cell growth

Specific growth rates (μ) at different times (t) were determined numerically after fitting the cell mass concentration (X) to a polynomial function and performing further calculations according to the equation:

$$\mu = \frac{1}{X} \frac{dX}{dt} \quad (7.1)$$

Lag phase duration (λ), maximum specific growth rate (μ_{\max}), and maximum biomass concentration (X_{\max}) were predicted by the modified Gompertz model represented below (ZWIETERING *et al.*, 1990) as a function of initial biomass concentration (X_0) and biomass concentration at different times ($X_{t_predicted}$, t):

$$\ln\left(\frac{X_{t_predicted}}{X_0}\right) = \ln\left(\frac{X_{\max}}{X_0}\right) \cdot \exp\left(\frac{\mu_{\max} \cdot \exp(1)}{\ln\left(\frac{X_{\max}}{X_0}\right)}(\lambda - t) + 1\right) \quad (7.2)$$

The Newton-Raphson method was used to solve Equation (7.2) using Microsoft Excel 7 software and find the values of the parameters that minimize the sum of the root mean square error between the observed and predicted values. Initial estimates of the parameters were required, and the choice of these values is critical because a poor starting point can result in divergence or an incorrect solution (LACERDA *et al.*, 2011). A reasonable initial estimate for the coefficient was obtained through the graph ($\ln X$) vs. (t).

The coefficient of determination (R^2) is an optimistic estimate of the quality of a linear regression between the predicted values ($X_{t_predicted}$) and the observed values ($X_{t_observed}$). This parameter was used to validate the model results.

$$R^2 = \frac{(\sum(X_{t_predicted} - \overline{X_{predicted}})(X_{t_observed} - \overline{X_{observed}}))^2}{\sum(X_{t_predicted} - \overline{X_{predicted}})^2 \sum(X_{t_observed} - \overline{X_{observed}})^2} \quad (7.3)$$

Generation time (t_g) is the time necessary to double the value of cell concentration, assuming that the specific growth rate is constant and maximum (μ_{\max}). Applying this definition to Equation 7.1, separating the variables, and performing the integration, we obtain

$$tg = \frac{\ln(2)}{\mu_{max}} \quad (7.4)$$

Biomass productivity (P_X) is the product of cell mass concentration (X) and specific growth rate (μ):

$$P_X = \mu \cdot X \quad (7.5)$$

2.5.2. Pigment content and irradiance inside of the culture

Following equations were used to evaluate the concentration of chlorophyll 'a' (C_a), chlorophyll 'b' (C_b) and total carotenoids ($C_{(x+c)}$) in the cells as function of absorbance at xxx nm (A_{xxx}) (WROLSTAD *et al.*, 2005a; b):

$$C_a (\mu\text{g/mL}) = 11.85 A_{664} - 1.54 A_{647} - 0.086 A_{630} \quad (7.6)$$

$$C_b (\mu\text{g/mL}) = 21.0 3A_{647} - 5.43 A_{664} - 2.66 A_{630} \quad (7.7)$$

$$C_{(x+c)} (\mu\text{g/mL}) = (1000 A_{470} - 1.9C_a - 63.14C_b) / 214 \quad (7.8)$$

The average irradiance inside a culture (I_{av}) was estimated using the Equations 9 and 10 as function of the irradiance at the reactor surface (I_0), the optical light path length (p), biomass concentration (X) and extinction coefficient (K_a) (ACIÉN FERNÁNDEZ *et al.*, 2001; LICHTENTHALER e BUSCHMANN, 2001; SCOTT, 2001; GARCÍA-MALEA *et al.*, 2005).

$$I_{av} = \frac{I_0}{K_a X p} (1 - \exp(-K_a X p)) \quad (7.9)$$

$$K_a = 0,086 + 0,0065(C_a + C_b) - 0,016C_{(c+x)} \quad (7.10)$$

2.5.3. Lipid accumulation and biodiesel quality

The lipid content (%Lipid) of the microalgae was calculated by the ratio between lipid weight (W_L) and dry biomass weight (W_X).

$$\% \text{Lipid} = \frac{W_L}{W_X} \quad (7.11)$$

Cetane number (CN) is the most important property for specifying biodiesel quality and was predicted using the following correlation:

$$CN = 62.2 + (0.017C_{12:0}) + (0.074C_{14:0}) + (0.115C_{16:0}) + (0.177C_{18:0}) - (0.103C_{18:1}) - (0.279C_{18:2}) - (0.366C_{18:3}) \quad (7.12)$$

3. Results and Discussion

Several studies carried out with *C. vulgaris* under different growth conditions have evaluated biomass growth, productivity, pigment content, lipid accumulation, and lipid profile, but the results were affected by a variety of factors, such as type and availability of nutrients, temperature, light intensity, culture age, and environmental stress. In this sense, cultures of *C. vulgaris* in bubble column photobioreactors were carried out under different light intensities (108, 420 or 700 $\mu\text{mol.m}^{-2}.\text{s}^{-1}$) to evaluate biomass growth and productivity, pigment content, light intensity distribution, lipid accumulation and biodiesel quality. However, it is very difficult to compare the values obtained in this work with those published in the literature.

3.1. Cell growth

In less than 24 hours after inoculation, light intensity of 700 $\mu\text{mol.m}^{-2}.\text{s}^{-1}$ resulted in complete cell death. This can be explained as an inhibition of the activity of photosystem II (PSII) when photosynthetic organisms are exposed to strong light. Therefore, the extent of photoinhibition depends on the balance between photodamage to PSII and the repair of such damage (MURATA *et al.*, 2007). In this case, we can observe that the rate of photodamage was greater than the rate of repair leading cell death.

Mathematical modeling was used to predict cellular growth by estimating λ , μ_{max} and X_{max} (LACERDA *et al.*, 2011). Statistical analysis of the model suggests an optimal

agreement between predicted and observed data, $0.998 < R^2 < 0.999$. **Table 7.2** contains data obtained with the modified Gompertz model (X_{\max} , λ , μ_{\max}), generation time, maximum pH, percentage of lipids in the early stationary phase, and maximum biomass and lipid productivities for the experiments. In **Figure 7.1**, cell concentration, pH and the fit of the mathematical models to biomass concentration and productivity are shown.

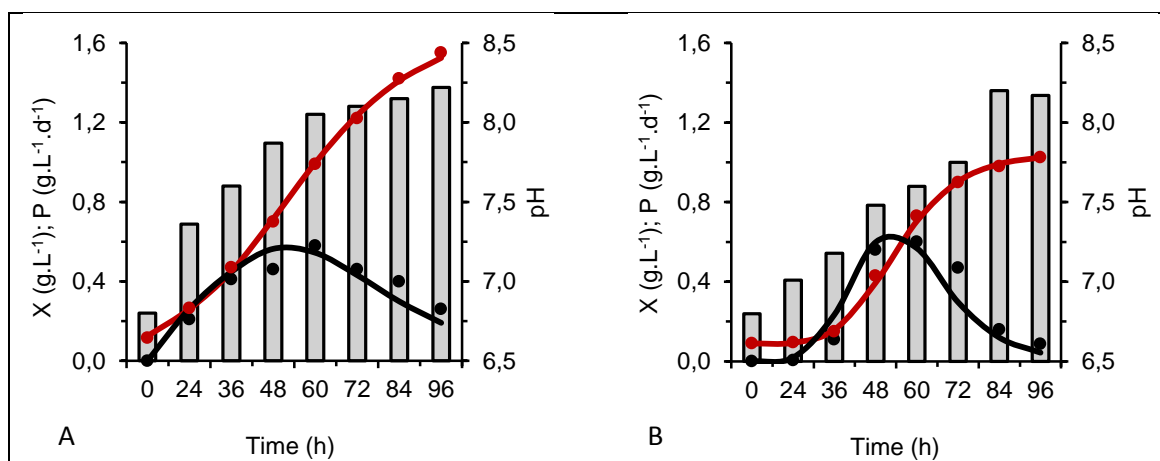


Figure 7.1: Impact of light intensity on growth parameters.

(A, B – 108 and 420 $\mu\text{mol.m}^{-2}.\text{s}^{-1}$, '—' $X_{t_predicted}$, '●' $X_{t_observed}$, '—' $P_{t_predicted}$, '●' $P_{t_observed}$, '□' pH).

Table 7.2: Growth kinetic parameters in different light availabilities.

$L I$ ($\mu\text{mol.m}^{-2}.\text{s}^{-1}$)	X_{\max} (g.L ⁻¹)	λ (d)	μ_{\max} (d ⁻¹)	tg (d)	P_{X_max} (g.L ⁻¹ .d ⁻¹)	pH _{max}
108	1.60	0.29	1.20	0.58	0.57	8.2
420	1.05	1.23	2.00	0.35	0.65	8.2

' X_{\max} ' maximum cell concentration, ' λ ' lag phase duration, ' μ_{\max} ' maximum specific growth rate, 'tg' generation time, ' P_{X_max} ' maximum biomass productivity.

3.2. Pigment Content

Chlorophyll 'a' is postulated as the only pigment supplying energy directly to the photosynthetic reaction. Chlorophyll 'b' functions photosynthetically as a light-harvesting

pigment transferring absorbed light energy to chlorophyll 'a' (HURST, 2002; LEE, 2008). Carotenoids have the same function of Chlorophyll 'b' and others accessories pigments, and the composition in the *Chlorophyceae* includes α -carotene, β -carotene, neoxanthin, lutein, violaxanthin, antheraxanthin and zeaxanthin (GOUVEIA *et al.*, 1996).

Photosynthetic pigments concentrations under different light intensities and during the experiments were analyzed and the results are shown in **Table 7.3** and **Figure 7.2**. In this work, carotenoid pigments were analyzed as total carotenoids and the composition were not determined.

Average pigment concentrations in the beginning of the experiments were similar in all cases evaluated and there was not a linear relationship between the biomass concentration and chlorophyll content during the experiments. With $108 \mu\text{mol.m}^{-2}.\text{s}^{-1}$, C_a/C_b and $C_a/C_{(c+x)}$ ratios varies approximately from 3:1 to 2:1, but with $420 \mu\text{mol.m}^{-2}.\text{s}^{-1}$, those ratios varies from 3:1 to 0.4 and 3:1 from 1.1. During the experiments was possible to visualize this variations as function of medium color that becomes green-yellow.

Others studies shows: i) chlorophyll content ($C_a + C_b$) ranges from 0.3% to 3.0% of the dry weight in all photosynthetic algae (LEE, 2008); ii) C_a/C_b ratio ranges between 3:1 and 2:1 (HURST, 2002; LEE, 2008); iii) 0.84 and 0.31 $\mu\text{g}/\text{mg}_{\text{biomass}}$ of chlorophyll 'a', chlorophyll 'b' in *C. vulgaris* cultured at 22 °C and $60 \mu\text{mol.m}^{-2}.\text{s}^{-1}$ (DE-BASHAN *et al.*, 2002); iv) decrease in chlorophyll 'a' content ($\cong 50\%$) and increase in β -carotene ($\cong 200\%$) of *C. vulgaris* with light intensity increase (37.5 to $100 \mu\text{mol.m}^{-2}.\text{s}^{-1}$) (SEYFABADI *et al.*, 2011).

Table 7.3: Pigment content of *C. vulgaris* cultured in different light availabilities.

Light Intensity ($\mu\text{mol.m}^{-2}.\text{s}^{-1}$)	C_a ($\mu\text{g}/\text{mg}$)	C_b ($\mu\text{g}/\text{mg}$)	$C_{(c+x)}$ ($\mu\text{g}/\text{mg}$)	C_a/C_b	$C_a/C_{(c+x)}$
initial	5.20	1.60	1.69	3.4	3.1
108	0.27	0.11	0.13	2.4	2.1
420	0.04	0.08	0.03	0.4	1.1

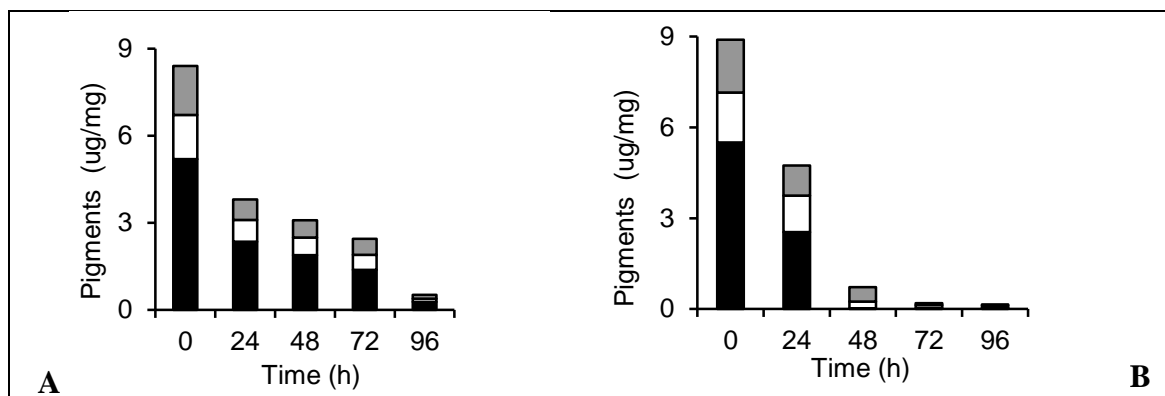


Figure 7.2: Pigments profile during the experiments.
 (A - $108\mu\text{mol.m}^{-2}.\text{s}^{-1}$, B - $420\mu\text{mol.m}^{-2}.\text{s}^{-1}$ [C_a ■; C_b □; $C_{(c+x)}$ ▒]).

As chlorophyll is a nitrogen-rich compound and is easily accessible, it is utilized as an intracellular nitrogen pool to support further cell growth and biomass production as the nitrogen in the media becomes depleted (ÖRDÖG *et al.*, 2012). With this growth conditions, nitrogen is a limiting substrate (data now showed), so one of the possible explanations could be that chlorophyll ‘a’ and chlorophyll ‘b’ levels decrease because chlorophyll was degraded to reutilize the nitrogen for growth or lipid accumulation.

3.3. Irradiance inside of the culture

Light profiles in a tubular photobioreactor are the key to algae growth (BANNISTER, 1979) and is highly influenced by microalgae biomass concentration, because light attenuation becomes faster as biomass concentration becomes denser. In this work, light attenuation profiles are calculated by solving Eq. (9) for different light intensities in each point of the batch cultures as a function of biomass concentration, pigment content, reactor internal diameter and length of the light path from the surface to any point in the bioreactor.

Figure 7.3 represent estimate light attenuation inside of the photobioreactor during the experiments. It was considered exponential decay of light intensity between surface and center of photobioreactor with possible generation of 3 illumination zones

with different regimes of growth in each (MIRÓN *et al.*, 1999; MERCHUK *et al.*, 2007): 1) extends from the illuminated wall till the point where the light energy just balances the energy needed for growth at the maximum rate (light saturation point) occurring photoinhibition; 2) second zone finishes at the point where the light energy just balance the energy needed for maintenance (light compensation point) occurring photolimitation; 3) third zone is poorly illuminated and growth will be negative because of lack of light (MERCHUK *et al.*, 2007).

Assuming that in *Chlorella* species, $120 \mu\text{mol.m}^{-2}.\text{s}^{-1}$ is light saturation point and $20 \mu\text{mol.m}^{-2}.\text{s}^{-1}$ is light compensation point (LLOYD *et al.*, 1977): i) first zone in photobioreactor will occur from the wall till the point with $120 \mu\text{mol.m}^{-2}.\text{s}^{-1}$ of light intensity; ii) second zone finishes at the point with $20 \mu\text{mol.m}^{-2}.\text{s}^{-1}$; iii) third zone occurs with less than $20 \mu\text{mol.m}^{-2}.\text{s}^{-1}$.

In both conditions evaluated, with 0.1 g.L^{-1} of biomass concentration ($t=0$ of experiments), center of the reactor has approximately 70% of incident light. After 96 h cell cultures showed concentrations below 2 g.L^{-1} and less than 10 and 14% of light incident available inside of the reactor. In this sense, we can assume a photolimitation zone ($108\text{-}20 \mu\text{mol.m}^{-2}.\text{s}^{-1}$) and negative growth ($<20 \mu\text{mol.m}^{-2}.\text{s}^{-1}$) in the tests with $108 \mu\text{mol.m}^{-2}.\text{s}^{-1}$. For the $420 \mu\text{mol.m}^{-2}.\text{s}^{-1}$ test, the created zones were photoinhibition ($420\text{-}120 \mu\text{mol.m}^{-2}.\text{s}^{-1}$) and photolimitation ($120\text{-}20 \mu\text{mol.m}^{-2}.\text{s}^{-1}$). **Figure 7.4** represents the relation between biomass concentration and % of light incident available inside of the reactor.

It was possible to conclude: i) when the biomass concentration is low, there is minimal variation in the spatial light attenuation profiles, and ii) the spatial light irradiance attenuates quickly when the biomass concentration is higher than 1 g.L^{-1} , and iii) therefore much of the space within the photobioreactor is dark because of the fast attenuation. Same conclusions were obtained by (KIM *et al.*, 2013).

Since biomass production is affected by this internal light profile, relatively large changes in light intensity in the concentrated algae suspensions are needed to improve yearly areal biomass production in tubular photobioreactors (BANNISTER, 1979). The

implications of this work are very significant in the area of microalgae culture, carbon dioxide mitigation and photobioreactor design (LEE *et al.*, 2012).

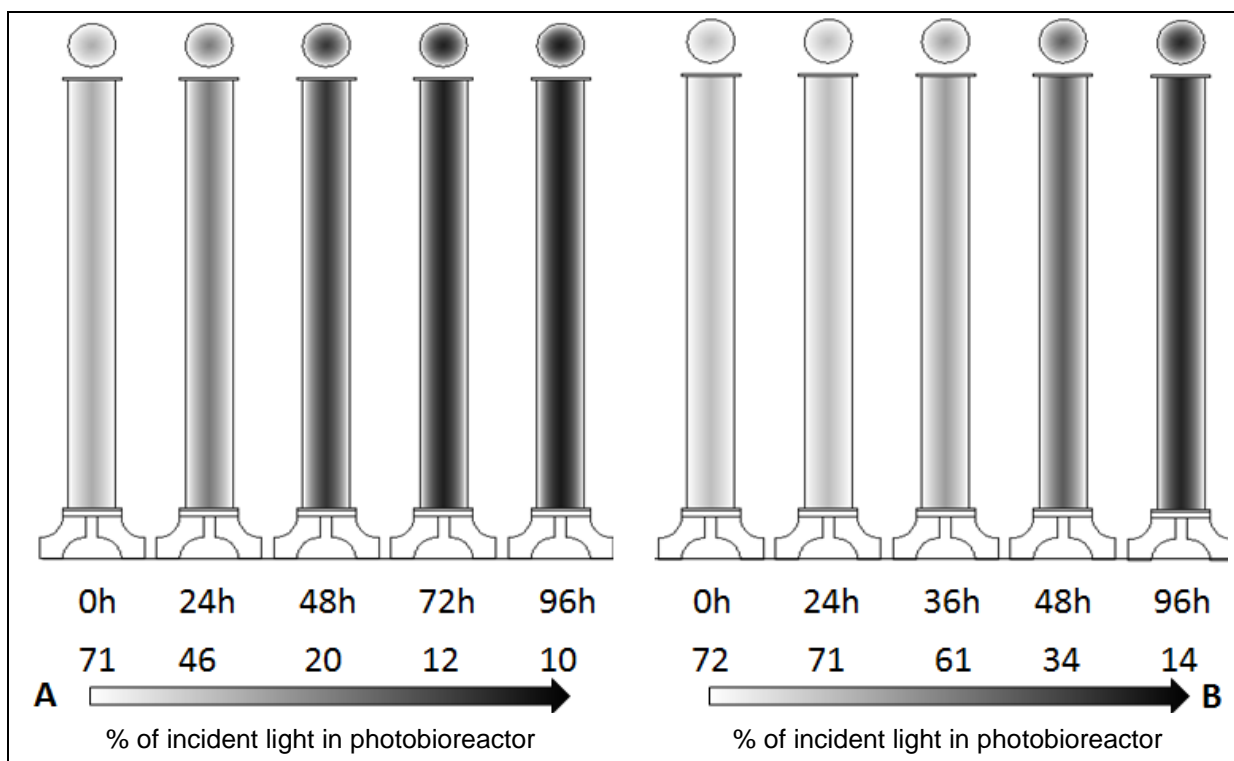


Figure 7.3: Light availability inside of the reactor during the experiments.
(A - $108\mu\text{mol.m}^{-2}.\text{s}^{-1}$, B - $420\mu\text{mol.m}^{-2}.\text{s}^{-1}$).

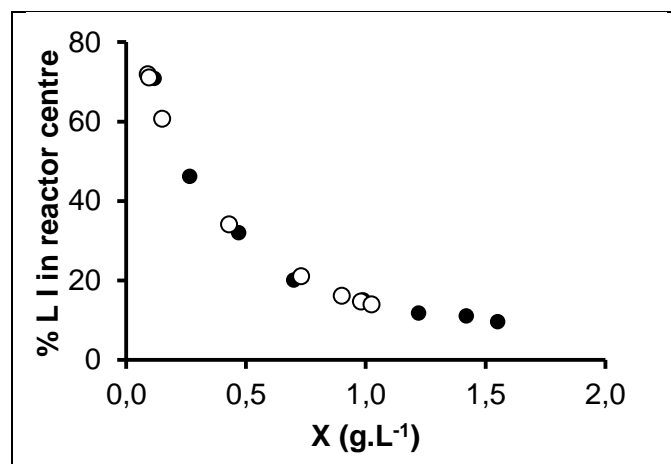


Figure 7.4: Light availability inside of the reactor as function of biomass concentration.
(● - $108\mu\text{mol.m}^{-2}.\text{s}^{-1}$, ○ - $420\mu\text{mol.m}^{-2}.\text{s}^{-1}$).

3.4. Lipid analysis and biodiesel quality

Is important to mention that the irradiance supply has a direct impact on the biochemical composition of microalgae cells including lipids and it can influence the metabolism of fatty acid synthesis. However, the effect of light on lipid production in microalgae is species specific (LEE *et al.*, 2012).

In this sense, lipid content and lipid profile were evaluated. The total lipid content in the dry biomass was 50 and 44% to 108 and 420 $\mu\text{mol.m}^{-2}.\text{s}^{-1}$, respectively. The amount of lipids in *Chlorella* cells decreased with the increase in light availability.

Results of the FAME profile in different experiments are shown in **Table 7.4**. The FAMES accumulated were C16:0, C16:1, C16:2, C16:3, C18:0, C18:1, C18:2, and C18:3 and others in small amounts. The same methyl esters were found in *C. vulgaris* by Petkov and Garcia (PETKOV e GARCIA, 2007). Based on these experiments it is possible to conclude that an increase in light intensity has a positive effect on the accumulation of MUFA and PUFA and a negative effect on the accumulation of SFA.

The FAMES most commonly found in biodiesel are C16:0, C18:0, C18:1, C18:2, and C18:3, but a variety of other FAMES can be found in small amounts in all oils and fats used as biodiesel sources (KNOTHE, 2008). It is important to note that these FAMES represent approximately 90% of the FAMES accumulated in the conditions tested.

Table 7.4: FAME profile of *C. vulgaris*.

LI ($\mu\text{mol.m}^{-2}.\text{s}^{-1}$)	FAMES (%)												
	C5:0	C16:0	C16:1	C16:2	C16:3	C18:0	C18:1	C18:2	C18:3	Others	SFA	MUFA	PUFA
108	0.51	25.18	0.81	1.36	5.32	5.99	40.89	6.12	12.72	1.11	31.68	41.70	25.52
420	0.45	21.66	0.94	0.00	6.42	2.94	44.35	6.40	15.09	1.75	25.05	45.29	27.91

Methyl levulinate (C5:0); Methyl palmitate (C16:0); Methyl palmitoleate (C16:1); Methyl hexadecadienoate (C16:2); Methyl hexadecatrienoate (C16:3); Methyl stearate (C18:0); Methyl oleate (C18:1); Methyl linoleate (C18:2); Methyl linolenate (C18:3); Saturated fatty acid (SFA); Monounsaturated fatty acid (MUFA); Polyunsaturated fatty acid (PUFA).

After identifying the FAMES in each sample, the properties of these esters were obtained from the literature (KNOTHE, 2005; MOSER, 2009; LAPUERTA *et al.*, 2010) and are presented in **Table 7.5**. These data were used to estimate the quality of biodiesel, as detailed in the Material and Methods section. Literature on C5:0, C16:2, and C16:3 is scarce. For this reason, some of the properties of C5:0 were estimated by C4:0 properties and some of the properties of C16:2 and 16:3 were estimated by the geometric proportion between the values of C18:0 to C18:3 and the values of C16:0 to C16:3.

Cetane number is the most important property for specifying biodiesel quality because is directly related to the ignition delay time, i.e. the time from injection of the fuel into the cylinder to the onset of ignition (BUCY *et al.*, 2012). The shorter the ignition delay time, the higher the cetane number is, and vice versa (GOPINATH *et al.*, 2009). In addition, very high or very low cetane numbers may cause incomplete combustion, smoke, and malfunction of the engines (KNOTHE, 2005). The cetane number predicted were 56 ($108 \mu\text{mol.m}^{-2}.\text{s}^{-1}$) and 53 ($420 \mu\text{mol.m}^{-2}.\text{s}^{-1}$) and in both cases were found to meet quality standards ANP 255/2003 (CN>45), ASTM D6751 (CN>47), and (EN14214>51).

Table 7.5: Cetane number of each FAME obtained from sources in the literature.

FAME	Formula	Molecular Weight (g/mol)	Cetane Number
Methyl levulinate	$\text{C}_6\text{H}_{10}\text{O}_3$	130.14	17.8 ^f
Methyl palmitate	$\text{C}_{17}\text{H}_{34}\text{O}_2$	270.46	74.5 ^a
Methyl palmitoleate	$\text{C}_{17}\text{H}_{32}\text{O}_2$	268.44	51 ^a
Methyl hexadecadienoate	$\text{C}_{17}\text{H}_{30}\text{O}_2$	266.42	33.1 ^b
Methyl hexadecatrienoate	$\text{C}_{17}\text{H}_{28}\text{O}_2$	264.10	20.7 ^b
Methyl stearate	$\text{C}_{19}\text{H}_{38}\text{O}_2$	298.51	101 ^a
Methyl oleate	$\text{C}_{19}\text{H}_{36}\text{O}_2$	296.49	59.3 ^a
Methyl linoleate	$\text{C}_{19}\text{H}_{34}\text{O}_2$	294.48	42.2 ^a
Methyl linolenate	$\text{C}_{19}\text{H}_{32}\text{O}_2$	292.46	22.7 ^a

Source: ^a (KNOTHE, 2005); ^b geometric proportion between the values of C18:0 to C18:3 applied to C16:0 to C16:3, ^c C5:0 properties were estimated by C4:0 properties.

4. Conclusions

Cultures of *C. vulgaris* in bubble columns photobioreactors were carried out using 108, 420 and 700 $\mu\text{mol.m}^{-2}.\text{s}^{-1}$. High photoinhibition was induced by 700 $\mu\text{mol.m}^{-2}.\text{s}^{-1}$ and complete cell death occurred in 24 hours after experiment start. Light intensity increase (108 to 420 $\mu\text{mol.m}^{-2}.\text{s}^{-1}$) has a positive effect in μ_{max} (1.02 to 2.0 d^{-1}), P_{max} (0.58 to 0.65 $\text{g.L}^{-1}.\text{d}^{-1}$), MUFA (42 to 45%), PUFA (26 to 28%), and a negative effect in X_{max} (1.6 to 1.00 g.L^{-1}), λ (0.5 to 1.2 d), C_a (0.27 to 0.04 $\mu\text{g/mg}$), C_b (0.11 to 0.08 $\mu\text{g/mg}$), $C_{(C+X)}$ (0.13 to 0.03 $\mu\text{g/mg}$), lipid content (50 to 44%), SFA (32 to 25%), CN (56 to 53). In both cases, after 96 h cell cultures showed concentrations below 2 g.L^{-1} and less than 10 and 14% of light incident available inside of the reactor, suggesting that the implications of this work are very significant in the area of microalgae culture, carbon dioxide mitigation and photobioreactor design and efforts needs to be employed to viable photosynthetic microalgae cultures.

5. Acknowledgement

Funding for this research was provided by the Fundação de Amparo a Pesquisa no Estado de São Paulo, FAPESP (Brazil); Capes; CNPQ and PETROBRAS.

6. References

- ACIÉN FERNÁNDEZ, F. G.; FERNÁNDEZ SEVILLA, J. M.; SÁNCHEZ PÉREZ, J. A.; MOLINA GRIMA, E.; CHISTI, Y. Airlift-driven external-loop tubular photobioreactors for outdoor production of microalgae: assessment of design and performance. **Chemical Engineering Science**, v. 56, n. 8, p. 2721-2732, 2001.
- ACIÉN FERNÁNDEZ, F. G.; GARCÍA CAMACHO, F.; CHISTI, Y. **Photobioreactors: light regime, mass transfer, and scaleup**. In: R. OSINGA, J. T. J. G. B. e WIJFFELS, R. H. (Ed.). Progress in Industrial Microbiology: Elsevier, v. Volume 35, 1999. p.231-247.
- ANDERSEN, R. A. **Algal culturing techniques**. Phycological Society Of America – Elsevier Academic Press, 2005.

BANNISTER, T. T. Quantitative description of steady state, nutrient-saturated algal growth, including adaptation. **Limnol. Oceanogr.**, v. 24, p. 76-96, 1979.

BARSANTI, L.; GUALTIERI, P. **Algae: Anatomy, Biochemistry, And Biotechnology**. New York: CRC Press, 2006.

BERBEROGLU, H.; YIN, J.; PILON, L. Light transfer in bubble sparged photobioreactors for H₂ production and CO₂ mitigation. **International Journal of Hydrogen Energy**, v. 32, n. 13, p. 2273-2285, 2007.

BLIGH, E. G.; DYER, W. J. A rapid method of total lipid extraction and purification. **Canadian Journal of Biochemistry and Physiology**, v. 37, n. 8, p. 911-917, 1959.

BUCY, H. B.; BAUMGARDNER, M. E.; MARCHESE, A. J. Chemical and physical properties of algal methyl ester biodiesel containing varying levels of methyl eicosapentaenoate and methyl docosahexaenoate. **Algal Research**, v. 1, n. 1, p. 57-69, 2012.

DE-BASHAN, L. E.; BASHAN, Y.; MORENO, M.; LEBSKY, V. K.; BUSTILLOS, J. J. Increased pigment and lipid content, lipid variety, and cell and population size of the microalgae *Chlorella* spp. when co-immobilized in alginate beads with the microalgae-growth-promoting bacterium *Azospirillum brasilense*. **Canadian Journal of Microbiology**, v. 48, n. 6, p. 514-521, 2002.

ERIKSEN, N. T. The technology of microalgal culturing. **Biotechnol Lett**, v. 30, n. 9, p. 1525-36, 2008.

GARCÍA-MALEA, M. C.; BRINDLEY, C.; RÍO, E. D.; ACIÉN, F. G.; FERNÁNDEZ, J. M.; MOLINA, E. Modelling of growth and accumulation of carotenoids in *Haematococcus pluvialis* as a function of irradiance and nutrients supply. **Biochemical Engineering Journal**, v. 26, n. 2-3, p. 107-114, 2005.

GOPINATH, A.; PUHAN, S.; NAGARAJAN, G. Relating the cetane number of biodiesel fuels to their fatty acid composition: A critical study. **Proceedings of the Institution of Mechanical Engineers, Part D: Journal of Automobile Engineering**, v. 223, n. 4, p. 565-583, 2009.

GOUVEIA, L.; VELOSO, V.; REIS, A.; FERNANDES, H.; NOVAIS, J.; EMPIS, J. Evolution of pigment composition in *Chlorella vulgaris*. **Bioresource Technology**, v. 57, n. 2, p. 157-163, 1996.

HURST, W. J. **Methods of analysis for functional foods and nutraceuticals**. Boca Raton: CRC Press, 2002.

JACOB-LOPES, E.; LACERDA, L. M. C. F.; FRANCO, T. T. Biomass production and carbon dioxide fixation by *Aphanothece microscopica Nägeli* in a bubble column photobioreactor. **Biochemical Engineering Journal**, v. 40, n. 1, p. 27-34, 2008.

KIM, J.; YOO, G.; LEE, H.; LIM, J.; KIM, K.; KIM, C. W.; PARK, M. S.; YANG, J.-W. Methods of downstream processing for the production of biodiesel from microalgae. **Biotechnology Advances**, n. 0, 2013.

KNOTHE, G. "Designer" Biodiesel: Optimizing fatty ester composition to improve fuel properties. **Energy Fuels**, v. 22, p. 1358–1364, 2008.

KNOTHE, G., GERPEN, J.V., KRAHL, J. **The biodiesel Handbook**. AOCS Press, 2005.

LACERDA, L. M. C. F.; QUEIROZ, M. I.; FURLAN, L. T.; LAURO, M. J.; MODENESI, K.; JACOB-LOPES, E.; FRANCO, T. T. Improving refinery wastewater for microalgal biomass production and CO₂ biofixation: Predictive modeling and simulation. **J Petrol Sci Eng**, v. 78, n. 3-4, p. 679-686, 2011.

LAPUERTA, M.; RODRÍGUEZ-FERNÁNDEZ, J.; ARMAS, O. Correlation for the estimation of the density of fatty acid esters fuels and its implications. A proposed Biodiesel Cetane Index. **Chemistry and Physics of Lipids**, v. 163, n. 7, p. 720-727, 2010.

LEE, D.-J.; LIAO, G.-Y.; CHANG, Y.-R.; CHANG, J.-S. Chitosan coagulation–membrane filtration of *Chlorella vulgaris*. **International Journal of Hydrogen Energy**, 2012.

LEE, R. E. **Phycology**. 4. Cambridge: Cambridge University Press, 2008.

LEWIS, T.; NICHOLS, P. D.; MCMEEKIN, T. A. Evaluation of extraction methods for recovery of fatty acids from lipid-producing microheterotrophs. **Journal of Microbiological Methods**, v. 43, n. 2, p. 107-116, 2000.

LICHTENTHALER, H. K.; BUSCHMANN, C. **Chlorophylls and Carotenoids: Measurement and Characterization by UV-VIS Spectroscopy**. In: (Ed.). Current Protocols in Food Analytical Chemistry: John Wiley & Sons, Inc., 2001.

LLOYD, N. D. H.; CANVIN, D. T.; CULVER, D. A. Photosynthesis and Photorespiration in Algae. **Plant Physiol.**, v. 59, p. 936-940, 1977.

MATA, T. M.; MARTINS, A. A.; CAETANO, N. S. Microalgae for biodiesel production and other applications: A review. **Renewable and Sustainable Energy Reviews**, v. 14, n. 1, p. 217-232, 2010.

MERCHUK, J. C.; GARCIA-CAMACHO, F.; MOLINA-GRIMA, E. Photobioreactor design and fluid dynamics. **Chem. Biochem. Eng. Q.**, v. 21, n. 4, p. 345–355, 2007.

MIRÓN, A. S.; GÓMEZ, A. C.; CAMACHO, F. G.; GRIMA, E. M.; CHISTI, Y. **Comparative evaluation of compact photobioreactors for large-scale monoculture of microalgae**. In: R. OSINGA, J. T. J. G. B. e WIJFFELS, R. H. (Ed.). *Progress in Industrial Microbiology*: Elsevier, v. Volume 35, 1999. p.249-270.

MOSER, B. Biodiesel production, properties, and feedstocks. **In Vitro Cellular & Developmental Biology - Plant**, v. 45, n. 3, p. 229-266, 2009.

MUÑOZ, R.; GUIEYSSE, B. Algal–bacterial processes for the treatment of hazardous contaminants: A review. **Water Research**, v. 40, n. 15, p. 2799-2815, 2006.

MURATA, N.; TAKAHASHI, S.; NISHIYAMA, Y.; ALLAKHVERDIEV, S. I. Photoinhibition of photosystem II under environmental stress. **Biochim Biophys Acta**, v. 1767, n. 6, p. 414-21, 2007.

ÖRDÖG, V.; STIRK, W.; BÁLINT, P.; STADEN, J.; LOVÁSZ, C. Changes in lipid, protein and pigment concentrations in nitrogen-stressed *Chlorella minutissima* cultures. **Journal of Applied Phycology**, v. 24, n. 4, p. 907-914, 2012.

PETKOV, G.; GARCIA, G. Which are fatty acids of the green alga *Chlorella*? **Biochemical Systematics and Ecology**, v. 35, n. 5, p. 281-285, 2007.

SCHUMANN, R.; HÄUBNER, N.; KLAUSCH, S.; KARSTEN, U. Chlorophyll extraction methods for the quantification of green microalgae colonizing building facades. **International Biodeterioration & Biodegradation**, v. 55, n. 3, p. 213-222, 2005.

SCOTT, K. J. **Detection and Measurement of Carotenoids by UV/VIS Spectrophotometry**. In: (Ed.). *Current Protocols in Food Analytical Chemistry*: John Wiley & Sons, Inc., 2001.

SEYFABADI, J.; RAMEZANPOUR, Z.; AMINI KHOEYI, Z. Protein, fatty acid, and pigment content of *Chlorella vulgaris* under different light regimes. **Journal of Applied Phycology**, v. 23, n. 4, p. 721-726, 2011.

STEIN, J. R. **Handbook of phycological methods. Culture methods and growth measurements**. London: Cambridge University Press, 1973. 1-448

WROLSTAD, R. E.; ACREE, T. E.; DECKER, E. A.; PENNER, M. H.; REID, D. S.; SCHWARTZ, S. J.; SHOEMAKER, C. F.; SMITH, D.; SPORNS, P. **Carotenoids**. In: (Ed.). *Handbook of Food Analytical Chemistry*: John Wiley & Sons, Inc., 2005a. p.71-119.

WROLSTAD, R. E.; ACREE, T. E.; DECKER, E. A.; PENNER, M. H.; REID, D. S.; SCHWARTZ, S. J.; SHOEMAKER, C. F.; SMITH, D.; SPORNS, P. **Chlorophylls**. In:

(Ed.). Handbook of Food Analytical Chemistry: John Wiley & Sons, Inc., 2005b. p.153-199.

ZWIETERING, M. H.; JONGENBURGER, I.; ROMBOUTS, F. M.; VAN 'T RIET, K. Modeling of the bacterial growth curve. **Appl Environ Microbiol**, v. 56, n. 6, p. 1875-81, 1990.

CAPÍTULO 8

PRELIMINARY TECHNO-ECONOMIC ANALYSIS OF C. VULGARIS PRODUCTION

Techno economic analysis of *C. vulgaris* production

Lucy Mara Cacia Ferreira Lacerda¹, Jeremy Woods ², and Telma Teixeira Franco¹

¹ School of Chemical Engineering, State University of Campinas, UNICAMP, 13083-970 Campinas-SP, Brazil, phone +55 (19) 3521 3966. E-mail: franco@feq.unicamp.br (T.T. Franco*).

² Centre for Environmental Policy and Porter Alliance, Imperial College London, UK

Highlights

1. Techno-economic analysis of biofuels production in large scale;
2. Highlight of the improvements in the process to a positive economic analysis;
3. Effort to achieve a large scale microalgal refinery;

Abstract

Techno economic models were constructed for the *C. vulgaris* cultured in bubble columns photobioreactors with focus on biomass & biodiesel production. It is a first estimate of the process performance that not represents the most optimized approach, but it is the process with more data available in the literature to perform the simulation. The positive evaluation of the techno-economic analysis leads to the start of plant construction, but, in this case, a negative makes all the work be revised, which demonstrates the importance of this analysis into the context of an industrial plant project. Despite of the negative economic evaluation, with our analysis was possible to highlight improvements in the process that needs to be achieved before that a large scale microalgal refinery become true and compete with oil refineries. Also, it was possible to conclude that, a multidisciplinary approach will be required, so that future technological advances get leads a drastically improvements in the economics of large scale biofuels production, revealing the full potential of microalgae to replace fossil fuels.

Keywords: techno-economic analysis, microalgae biorefinery, process improvements, new technologies.

1. Introduction

Biodiesel commonly consists methyl esters, originally derived from plant or animal oils and fats (DEMIRBAS, 2011). Several reasons make biodiesel an attractive energy resource in Brazil: it mostly comes from renewable resources, is highly biodegradable, has minimal toxicity, decreases dependence on foreign crude oil, can be used in existing diesel engines with little or no modification, and resulting in very low release of harmful chemical substances (AHMAD *et al.*, 2011). In this sense, biodiesel can substantially replace conventional diesel, reduces exhaust pollution (GALLAGHER, 2011) and offers numerous benefits related to energy security, economics, and the environment (NIGAM e SINGH, 2011).

Third-generation biodiesel are derived from microbes and microalgae (NIGAM e SINGH, 2011) and are called advanced biodiesel (OLTRA, 2011). It is considered to be a viable alternative energy resource that is devoid of the major drawbacks associated with first and second-generation biodiesel (NIGAM e SINGH, 2011), but there are still challenges (technological, economic, environmental and socio-political) that need to be addressed (OLTRA, 2011).

Experts agree that a future overall approach would adopt an integrated algal-based biorefinery model, where valuable co-products such as oils, proteins and carbohydrates would complement biodiesel production (OLTRA, 2011). Therefore, large-scale microalgae biodiesel requires a combination of technical innovations and feasible implementation (SUN *et al.*, 2011) and a techno-economic is a necessary step to analyze the changes to make algae a feasible feedstock for biodiesel.

In this sense, we constructed a techno economic model for the production of biomass and biodiesel based on photosynthetic microalgae cultures. Our intention was to provide a first estimate of the technical and economic performance of the *Chlorella vulgaris* CPCC 90 cultured in bubble columns photobioreactors to produce biodiesel.

2. Process description

The purpose of the techno-economic assessment is to highlight various technological possibilities and economic aspects involved in the microalgae production and help to select the best production scenarios. The technological assessment involves the analyses of the upstream and downstream processes, since different techniques are available for each step. The key process considerations are described below:

Strain selection: A multi-criteria strategy is necessary to select the microalgae strain. Several parameters need to be analyzed, such as: growing rate, lipid content, resistance to environmental conditions changes (temperature, nutrients input, light, competition from other microalgae species and/or bacterial), ease of biomass separation and processing, possibility of obtaining other valuable chemicals (MATA *et al.*, 2010).

Media selection: Growth culture medium must provide the inorganic elements that constitute the algal cell (CHISTI, 2007) and the minimal nutritional requirements can be estimated using the approximate molecular formula of the microalgal biomass ($\text{CO}_{0.48}\text{H}_{1.83}\text{N}_{0.11}\text{P}_{0.01}$) (RICHMOND, 2004). Essential elements include carbon I, nitrogen (N) and phosphorus (P), major ions are Mg^{2+} , Ca^{2+} , Cl^- , and SO_4^{2-} , and minor ions are metals such as iron, manganese, zinc, cobalt, copper, and molybdenum (DRAGONE *et al.*, 2010). While N must be added carefully as a function of the target bio-product, P must be supplied in significant excess because the phosphates added complex with metal ions, therefore, not all the added P is bio-available (DRAGONE *et al.*, 2010).

Carbon source: Algae can be autotrophic, mixotrophic or heterotrophic. Autotrophic cultures will assimilate an inorganic carbon source (CO_2 , HCO_3^-), while heterotrophic cultures require an organic carbon source (glucose, fructose, xylose, sucrose, acetate, and others). In mixotrophic cultures, both carbon sources can be used (BRENNAN e OWENDE, 2010).

Bioreactor system: Major classes of autotrophic microalgae growth systems are open ponds (natural ponds – lakes, lagoons, ponds; artificial ponds – raceway, circular reactor, rectangular reactor) and photobioreactors (bubble column, airlift, flat plate, and

helical – horizontal, vertical or inclined) and fermentors (heterotrophic cultures). The advantages of the photobioreactors in comparison with the open pond are: i) lower contamination risk and water losses; ii) better conditions for standardization and reproducibility; iii) less complicated control process; iv) higher biomass concentrations and photosynthetic efficiency; and v) lower dependence of the weather. The disadvantages are related to the costs (GROBBELAAR, 2009). Cultivation in fermenters eliminates the requirement for light and offers the possibility of greatly increasing cell concentration (BRENNAN e OWENDE, 2010).

Culture conditions: Temperature, light intensity, light quality (frequency and wave-length), light cycles (day/night and seasons of the year), pH, aeration, salinity, and nutrients availability are the most important parameters to be optimized to maximize biomass yield (RICHMOND, 2004). Also that, manipulate the culture conditions using two culture stages can be used to improve the yield of the target product. The first stage is used to promote the biomass growth, and the second stage is used to increase the product yield.

Operation mode: Batch culture is the most common method for microalgae cultivation. In this method, composition of the content changes continuously, there is no material flow and cell concentration rise until complete exhaustion of limiting nutrient. Continuous operation mode occurs when fresh material is introduced at the same time that culture is removed continuously (chemostat) or intermittently (turbidostat) (RICHMOND, 2004).

Harvesting process: The processes are flocculation, flotation, filtration, sedimentation, centrifugation, ultrasonic aggregation, and others (GREENWELL *et al.*, 2009; BRENNAN e OWENDE, 2010). Generally, microalgae harvesting occurs in two stages process (MOLINA GRIMA *et al.*, 2003). The first stage technologies use flocculation, flotation and gravitational sedimentation to promote the separation of the biomass from the bulk suspension. In the second technologies, can be used centrifugation, filtration and ultra-sound to promote the slurry concentration (BRENNAN e OWENDE, 2010). The choice of harvesting technique depends mainly on the

characteristics of the microorganism, i.e., size, density and value of products being obtained (OLAIZOLA, 2003).

Culture media recycle: Large scale continuous cultures can present very high culture volumes and recycle culture medium could therefore save much water, reduce nutrient inputs, and lower the economic and ecological impacts of the process. Despite that advantages negative effects can occur in the biomass growth due to the accumulation of: i) metabolites released during growth when physiological stress or cell lyses occur, in particular in cultures at high biomass concentrations; ii) minerals which are not, or only poorly assimilated by the microalgae, leading to a gradual change in the composition and in the physical-chemical properties of the growth medium. (RICHMOND, 2004; HADJ-ROMDHANE *et al.*, 2012a).

Dewatering process: Options include sun drying, spray drying, drum drying, fluidized bed drying, freeze drying, and others. Sun drying is the cheapest dehydration method; but main disadvantages include long drying times, the requirement for large drying surfaces, and the risk of material loss. Spray drying is commonly used for extraction of high value products, but it is relatively expensive and can cause significant deterioration of some algal pigments. Freeze drying is equally expensive, especially for large scale operations, but it eases extraction of oils (BRENNAN e OWENDE, 2010).

Cell disruption: Complete destruction of the cell wall is an important step to release of all intracellular components. Non-specific destruction is usually achieved by mechanical means (bead mill, ultrasound, homogenizer), while non-mechanical (physical, chemical, and enzymatic) methods are more specific and gentler (GECIOVA *et al.*, 2002). The choice cell disruption method depends mainly of the product nature. The mechanical methods are the most appropriated for large scale. Many process aims to eliminate this operation.

Extraction process: The process uses expeller/press, solvent extraction using chemicals, and supercritical fluid extraction (AHMAD *et al.*, 2011).

Biodiesel production: The most commonly used reaction is transesterification, also called alcoholysis. In the transesterification process, triglycerides are converted to esters (nearly 90%) and glycerol (10%) (AHMAD *et al.*, 2011). A reasonable conversion rate is obtained using a catalyst, that can be basic ones (KOH, NaOH), acid (HCl, H₂SO₄), and solid (Nb₂O₅, Pt-Sn/Al₂O₃). Basic catalyst can produce water that will form soap, reducing biodiesel yield and causes difficulty in product separation (MIAO *et al.*, 2009). Acid catalyst can conduct simultaneously esterification and transesterification with high yield, but needs higher reaction conditions (temperature, pressure, time) (MIAO *et al.*, 2009). Solid catalysts has higher activities and no soap formation, but require high temperature, pressure, and time (MIAO *et al.*, 2009). The residual biomass has an energy value and can be converted into various energy forms, such as biogas, electricity or hydrogen (CHISTI, 2008a). In this, sense many studies focused on the utilization of microalgal biomass residue from biofuel production processes (DE PAOLI *et al.*, 2011) strongly recommend the use of the residue as a suitable feedstock for bioenergy production, thereby reducing the cost of making bioenergy (PARK *et al.*, 2012)

Biogas production: Anaerobic digestion can be used in the conversion of residual biomass into a biogas, which consists of primarily methane (CH₄) and carbon dioxide, with traces of other gases such as hydrogen sulphide (BRENNAN e OWENDE, 2010). The theoretical methane yield expressed as normal liters of methane per gram volatile solids (L_{CH₄}/g_{VS}) for lipids, proteins and carbohydrates are 1.01, 0.85 and 0.42, respectively. Microalgae biogas has high energy content (> 60% methane), normally not contain sulfur which causes corrosion in engine generators, but need 20-30 days of retention time (SIALVE *et al.*, 2009). This process produced methane which can further be converted to produce electricity (SINGH e GU, 2010).

Waste management: The liquid effluent of the anaerobic digesters can be reused in agriculture, because it contains most of the added nutrients (CHISTI, 2008b; SINGH e GU, 2010). Residual biomass after anaerobic digestion contains nutrients that can be recovered and used for the algal growth system. It is possible assume that 65% of the total nutrients could be recovered through anaerobic digestion and only 35% of

the nutrients needs to be acquire from the fertilizer industry (CHISTI, 2008b; SINGH e GU, 2010).

Bioproducts: Different value added products (**Table 8.1**) can be obtained from fractions of microalgae biomass or even using the whole biomass. In this sense, to choose among different techniques, the value added to the target product must be evaluated.

Table 8.1: Microalgae products classified as function of commercial value

Value	Product
<u>High</u>	Astaxanthin, betacarotene, poly unsaturated fatty acid, coenzyme, anti-cellulite, skin anti-ageing, sensitive skin treatment, antimicrobial, antiviral, antifungal, neuroprotective products
<u>High-Medium</u>	Single cell protein, agar, alginate, carrageenan, paints, dyes (ice cream, jelly, candies, juices, lipstick, creams, lotions), colorants, chlorophyll, phycocyanin, phycoerythrin, fucoxanthin
<u>Medium-Low</u>	Aquaculture feed, animal feed, fertilizer, biopolymers, Bioplastics, lubricants, wastewater treatment, nutrient credits, flue gas treatment, CO ₂ capture/C credits, biodiesel, biogas, bioethanol, biohydrogen.

3. Material & Methods

3.1. Process design

Process design and technology selection was discussed by some authors before modeling. All processes simulations were built using commercial software SuperPro Design v8.5 and had a production scale of 10 ton of dry biomass per year, considering 330 days per year of operation. Sensitivity analysis in relation of production scale and product price was performed.

Biomass production and harvesting process have sufficient experimental data from previous works in our laboratory to model them in detail:

- i) Microorganism strain: *Chlorella vulgaris* (CPCC 90);
- ii) Culture medium: main compounds of BBM (g.L⁻¹) – NaNO₃ (0.500), NaCl (0.025), KH₂PO₄ (0.175), K₂HPO₄ (0.075), MgSO₄.7H₂O (0.075), Na₂EDTA (0.050), CaCl₂.2H₂O (0.025); (STEIN, 1973);
- iii) Sun light associated with solar collectors connected with fluorescent lamps to provide continuously light.
- iv) Carbon availability: continuous aeration of 1VVM with the injection of air containing 8.5% of CO₂; CO₂ input in the first stage photobioreactors is send to the 2º stage photobioreactors and the CO₂ not converted in biomass is lost to the atmosphere.
- v) Bioreactor design: 0.08 m of diameter. Photobioreactor built in rigid plastic was considered. Spatial distribution of reactors includes 9 rows in a vertical stack with 0.08 m of horizontal distance between vertically stacked tubes, and 0.75 m between the tubes rows. **Figure 8.1** represents the tubular reactors systems used in Algae PARC in Wageningen (The Netherlands), that were used as base to calculate the land requirement for biomass production in this work;
- vi) Land requirement: Considering the tubular system used in the Algal PARC (Wageningen), the dimensions needed to install the photobioreactors are detailed in **Table 8.2**;
- vii) Harvesting process: Flocculation process with organic polymer;
- viii) Carbon and water source: It was assumed that the process will be associated with a petroleum refinery (UN-REPLAN/PETROBRAS) to use CO₂ from flue gases, water from wastewater and will be located in a sunny area to maximize the light availability.
 - a. It is located in Paulínia-SP with an annual average temperature of 22 °C, 12 h of light availability;

- b. Annual emission of approximately 3,131 ton of CO₂ (2008).
- c. Wastewater collected from the discharge point of the treatment with pH of 8.3, 28 °C, and composition of (mg.L⁻¹): Nitrite (0.1), Nitrate (15.4), Ammonia (1.2), Phosphate (0.5), Phenol (0.02), Cyanide (0.04), TSS (0.13), supplemented with culture media salts (LACERDA *et al.*, 2011). Approximately values for all months considered (May to November of 2008).



Figure 8.1: Tubular reactor system at Algal PARC in Wageningen used as base for evaluate the dimensions of land for biomass production in this work.

Font: (<http://www.wageningenur.nl/en/Expertise-Services/Facilities/AlgaePARC.htm>)

Table 8.2: Description of land requirement for biomass production.

Variable	Biomass Production Capacity (kton)					
	1	2	5	10	15	20
# of rows in 1 st stage	10	20	25	33	43	50
# of rows in 2 nd stage	9	-	22	30	38	45
Length of rows (m)	1000	1000	2000	3000	3500	4000
Width in 1 st stage (m)	829	1682	2067	2742	3530	4114
Width in 2 nd stage (m)	747	-	1864	2474	3184	3711
Area (m ²)	3576	3682	7931	11216	13713	15825

- i) Water loss: 10% of PBR volume at every recycle caused by evaporation and harvesting process (HADJ-ROMDHANE *et al.*, 2012b);
- ii) Experimental results: $\mu_{\max}=1.02 \text{ d}^{-1}$; $P_{\max}=0.58 \text{ g.L}^{-1}.\text{d}^{-1}$; $CB_{\max}=1.06 \text{ g.L}^{-1}.\text{d}^{-1}$; $RE>95\%$ with $0.08\text{g}_{\text{org_coag}}/\text{g}_{\text{biomass}}$ (without need pH correction) and using filtration after flocculation. Biomass composition (DW): 18% of lipids, 51% carbohydrates, 29%proteins, 2%ash (estimated by literature results (ILLMAN *et al.*, 2000)).

The downstream processes were chosen because there sufficient literature data to model them (EHIMEN *et al.*, 2009; EHIMEN *et al.*, 2010; EHIMEN *et al.*, 2011; ZAMALLOA *et al.*, 2011; CHOWDHURY *et al.*, 2012; ZAMALLOA *et al.*, 2012). Others alternatives couldn't be analyzed for lack of important data, but this analysis can be expanded or improved as data become available to evaluate other configurations or include more processes to use all biomass fractions, such as ethanol production using carbohydrates fraction.

- iii) Dewatering process: Less than 0.3% of water in the dry biomass
- iv) Biodiesel production: Direct transesterification reaction using acid catalyst with ratio of MeOH / H₂SO₄ / oil 340/1/1, 60 °C, 8 h, 90 % yield in each of the transesterification reactions with an overall efficiency of 99% (HAAS *et al.*, 2006), 95 % recovery of MeOH, 98 % recovery of hexane.
- v) Biodiesel purification: acid neutralization with NaOH or CaO, moisture content minimized with sodium sulfate produced during neutralization process. Biodiesel with 99% of FAMES.
- vi) Biogas production: 37°C, 360h of retention time (ZAMALLOA *et al.*, 2011). For the proposed model, it is assumed that the algal biomass will be digested associated with glycerol generated during biodiesel production with at least 222 mL_{CH₄} per gram of residual biomass (dry)(EHIMEN *et al.*, 2009).

- vii) Solid waste management: Nutrients recycled after anaerobic digestion: 65% (CHOWDHURY *et al.*, 2012).
- viii) Liquid waste management: Reuse in agriculture because contains most of the added nutrients (SINGH e GU, 2010).

3.2. Economic analysis

Finalized the technological process definition and solved the material and energy balances for the facilities, a full cost calculations was evaluated. In this sense, Total Plant Direct Cost (TPDC); Total Plant Indirect Cost (TPIC); Total Plant Cost (TPC); Contractor's Fee & Contingency (CFC); Direct Fixed Capital Cost (DFC); Total Investment Cost (TIC); Annual Operating Cost (AOC), Annual Revenues (AR), Gross Margin (GM), Return of Investment (ROI), Payback Period (PBP) and Net present value (NPV) were calculated using SuperPro Design v8.5 and a sensitive analysis as performed using different production scales and product prices.

- i) The order of magnitude estimation for economic analysis was performed using Land factor, where the cost of a process plant was obtained by multiplying the basic equipment cost by the land factors (Equation 8.1) described in **Table 8.3** (rough approximations for solid-fluid processing plants).

$$\text{Cost} = F_L \cdot \text{Equipment Cost}(\text{Purchase} + \text{Delivery}) \quad (8.1)$$

- i) As the economic analysis was performed by Lang Factor, cost of equipment purchased is the basis of the method. In this sense, equipment cost was obtained by: i) prices from suppliers obtained in SuperPro data bank corrected by current cost index (Marshall and Swift Cost Index), operational capacity, material of construction, currency, and others parameters material factor, ii) prices estimated by literature data (PETERS *et al.*, 2003) corrected with the same parameters described above.

Table 8.3: Lang factor for solid-fluid industries based in delivered equipment cost.

Cost type	Item	Lang Factor
<u>Direct costs</u>	Purchased equipment (delivered)*	1.00
	Purchased-equipment installation	0.39
	Instrumentation and controls (installed)	0.13
	Piping (installed – include labor, valves, fittings, pipe, supports)	0.31
	Electrical (installed)	0.10
	Buildings (including services)	0.29
	Yard improvements	0.10
	Service facilities (installed)	0.55
	Land (if purchase is required)	0.06
	Total direct plant cost	2.93
<u>Indirect costs</u>	Engineering and supervision	0.32
	Construction expenses	0.34
	Total indirect plant costs	0.66
<u>Fixed-capital investment</u>	Contractor's fee (about 5% of direct and indirect plant costs)	0.18
	Contingency (about 10% of direct and indirect plant costs)	0.36
	Fixed-capital investment	4.13
	Working capital (about 15% of total capital investment)	0.74
<u>Total capital investment</u>		4.87

*Purchase + Delivery = 1.1(Purchase)

- ii) Total capital investment was evaluated in terms of direct capital, indirect capital and working capital.
- iii) The production cost is calculated as a function of direct production costs (raw material, operating labor, utilities, maintenance and repairs, operating supplies), fixed charges (local taxes, insurance), plant overhead costs and general expenses (administrative, distribution and marketing, research and development).
- iv) Startup cost was defined as 8% of fixed-capital investment. This cost represents the changes that quite frequently have to be made after plant construction to the plant operates at maximum design conditions. These changes involve expenditures for materials and equipment and result in loss of income while the plant is shut down or is operating at only partial capacity.

- v) Payback period (PBP) was calculated using the product price in order to obtain a proper length of time required to recover the cost of an investment without taking into account the time value of money.
- vi) With the products prices and the annual production cost, the method for measure venture profitability was the return on investment (ROI):

$$ROI (\%) = \frac{\text{annual net profit}}{\text{total capital investment}} 100 \quad (8.2)$$

- vii) Net present value was evaluated and represents a capital budgeting to analyze the profitability of an investment or project taking into account the time value of the cash flows. Where T=time (years), C_t is the net cash flow during period t, C_0 is the initial investment and d=the discount rate (Equation 8.3):

$$NPV = \sum_{t=1}^T \frac{C_t}{(1+d)^t} - C_0 \quad (8.3)$$

4. Results and Discussions

4.1. Biomass production

Figure 8.2 shows the process flow diagram (PFD) of biomass production with the relationships between the major components in the system. Total world production of dry algal biomass is estimated at about 10,000 tons per year (BENEMANN, 2008), but *Chlorella* annual production is about 2,000 tons of dry weight. In this case, was simulated 5 production scales (1,000; 2,000; 5,000; 10,000; and 20,000 tons per year). All economic parameters that are independent of sell price are presented in **Table 8.4**. Sell prices of € 36/kg (human nutrition and cosmetics) or € 50/L (aquaculture) were reported (PULZ e GROSS, 2004; BRENNAN e OWENDE, 2010). In this sense, 4 biomass sales prices were evaluated (10, 20, 30, 40 \$/kg). The economic parameters calculated as a function of product price are presented in **Figure 8.3**.

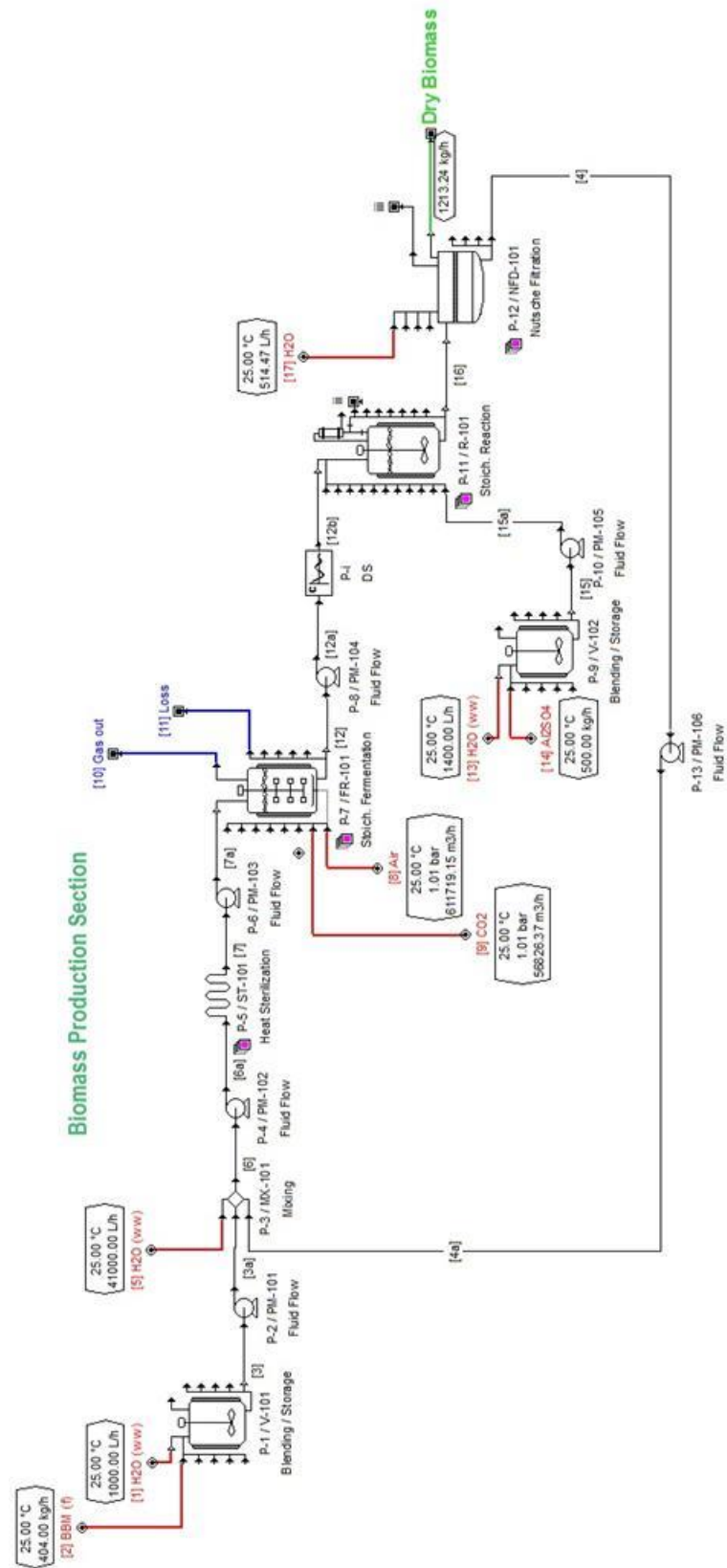


Figure 8.2: PFD of microalgal biomass production.

Table 8.4: Economic evaluation summary (2012 prices in \$).

Cost Description	Annual Production Capacity (kTon)				
	1	2	5	10	20
<u>Total Plant Direct Cost (TPDC)</u>					
Equipment Purchase	9,963,000	18,276,000	44,654,000	87,024,000	172,201,000
Installation	3,608,000	6,663,000	16,361,000	31,935,000	63,193,000
Process Piping	3,088,000	5,666,000	13,843,000	26,978,000	53,382,000
Instrumentation	1,295,000	2,376,000	5,805,000	11,313,000	22,386,000
Insulation	299,000	548,000	1,340,000	2,611,000	5,166,000
Electrical	996,000	1,828,000	4,465,000	8,702,000	17,220,000
Buildings	2,889,000	5,300,000	12,950,000	25,237,000	49,938,000
Yard Improvement	996,000	1,828,000	4,465,000	8,702,000	17,220,000
Auxiliary Facilities	5,479,000	10,052,000	24,560,000	47,863,000	94,711,000
TPDC	28,614,000	52,536,000	128,442,000	250,366,000	495,418,000
<u>Total Plant Indirect Cost (TPIC)</u>					
Engineering	9,157,000	16,812,000	41,102,000	80,117,000	158,534,000
Construction	9,729,000	17,862,000	43,670,000	85,124,000	168,442,000
TPIC	18,885,000	34,674,000	84,772,000	165,242,000	326,976,000
<u>Total Plant Cost (TPC)</u>					
TPC	47,499,000	87,210,000	213,214,000	415,608,000	822,394,000
<u>Contractor's Fee & Contingency (CFC)</u>					
Contractor's Fee	2,375,000	4,360,000	10,661,000	20,780,000	41,120,000
Contingency	4,750,000	8,721,000	21,321,000	41,561,000	82,239,000
CFC	7,125,000	13,081,000	31,982,000	62,341,000	123,359,000
<u>Direct Fixed Capital Cost (DFC = TPC+CFC)</u>					
DFC	54,624,000	100,291,000	245,197,000	477,949,000	945,753,000
<u>Total Investment Cost (TIC = DFC+WC+SC)</u>					
Working Capital (WC)	770,000	1,147,000	2,182,000	3,931,000	7,415,000
Startup Cost (SC)	2,731,000	5,015,000	12,260,000	23,897,000	47,288,000
Total Investment	58,126,000	106,453,000	259,638,000	505,777,000	1,000,456,000
<u>Annual Operating Cost (AOC)</u>					
Raw Material	3,607,000	7,215,000	18,037,000	36,075,000	72,150,000
Labor	4,327,000	4,327,000	4,328,000	4,328,000	4,328,000
Depreciation	5,189,000	9,528,000	23,294,000	45,405,000	89,847,000
Other Facilities	5,167,000	9,485,000	23,188,000	45,198,000	89,436,000
Utilities	538,000	1,075,000	1,634,000	2,835,000	5,089,000
AOC	18,828,000	31,630,000	70,481,000	133,840,000	260,849,000

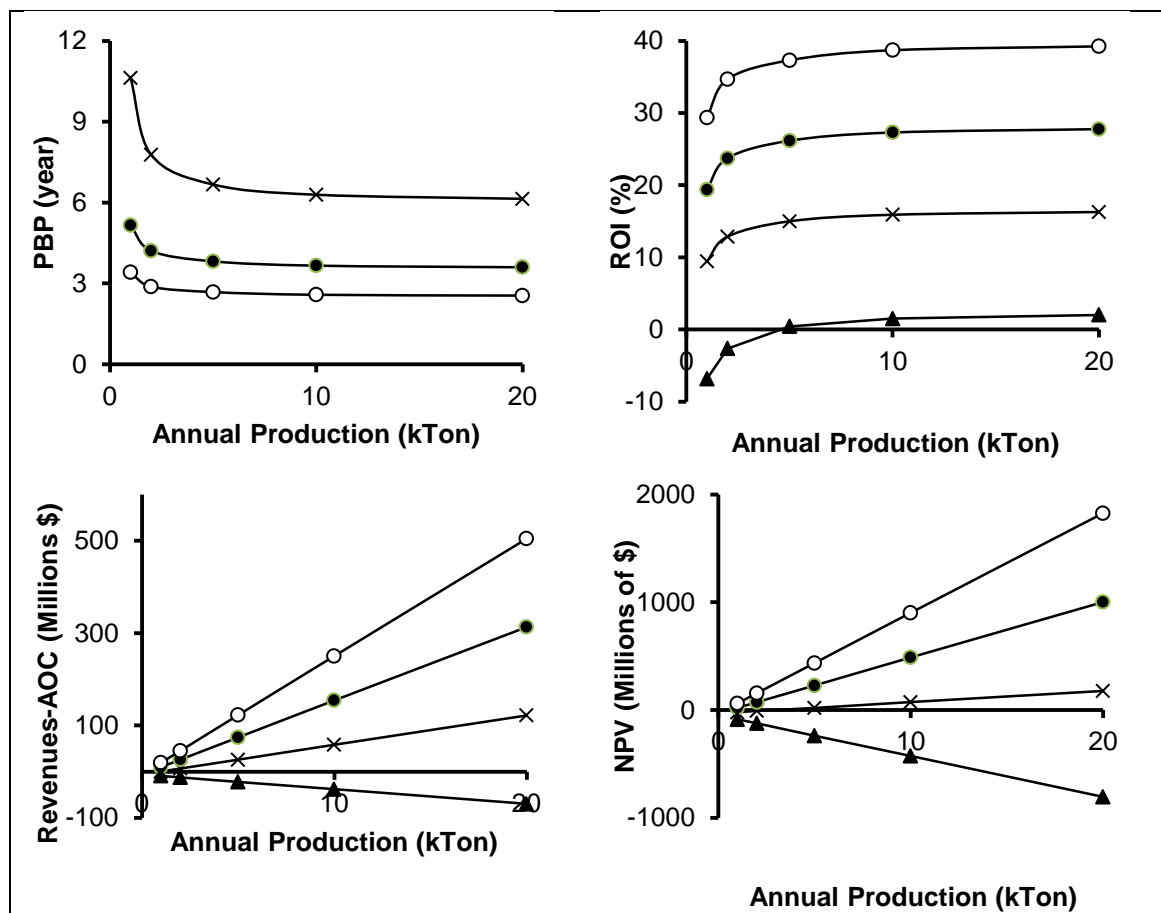


Figure 8.3: Impact of product price in the economic evaluation (2012 prices in \$).

(‘▲’ 10 \$/kg, ‘×’ 20 \$/kg, ‘●’ 30 \$/kg, ‘○’ 40 \$/kg)

Using a selling price of 20 \$/kg or more, all scales had a positive economic analysis and this biomass could be applied to produce one or more of the products described in Table 1, excluding food and pharmaceutical grad, with proper treatment as wastewater and flue gas were simulated as raw materials. However, with the amount of biomass produced, could be not easy to find a value-added co-product with comparable market scale.

4.2. Biofuels production

Total world consumption of biodiesel in 2011 was approximately 370 thousand of barrels per day (135 millions of barrels per year) with Brazil as the third largest

consumer (45 thousand of barrels per day that correspond to 7.2×10^6 L per year). Also that, microalgae demand for biodiesel production, considering to replace only a 5% of the US, Brazil or UK demand of gasoline (26.1 , 1.1 or 1.0×10^9 L/year, respectively) is more than 45.1 , 2.0 , and 1.8 Mt/year, respectively, of oil rich biomass (assuming 50% of lipid content on biomass and that 1 kg of oil results in 1 kg (1.16 L) of biodiesel).

Figure 8.4 shows the process flow diagram (PFD) of biofuel production with the relationships between the major components in the system. Process scale was defined as 10 kton/year of microalgae biomass that corresponds to less than 5% of annual biodiesel demand in Brazil. Others 4 scales (1, 5, 15, and 20 kton of biomass per year) were simulated to verify the impact of production capacity in the economic analysis. Biodiesel production in each scale was approximately 0.6, 2.9, 5.8, 8.7, and 11.6×10^3 m³/year, for 1, 5, 10, 15, 20 kton of biomass, respectively. A second stage of biomass culture was added to improve the lipid accumulation and FAMES profile of the *C. vulgaris*, since two-stage culture of microalgae is a culturing process that manipulates the culture conditions and/or nutrient feed in terms of the period and concentration (SUALI e SARBATLY, 2012) and can be successfully applied to achieve the goal of the bioproduct production.

All economic parameters that are independent of sell price are presented in **Table 8.5**. Sell prices for biodiesel and biogas are chose as function of commodities prices in February of 2013 (\$107 per barrel of crude oil and \$135 per 1×10^3 m³ of natural gas), and the proportion between algal oil price (\$ per gallon) and crude oil price (\$ per barrel) proposed by CHISTI in 2007.

In all scales tested these prices leads to a highly negative evaluation of the economic analysis. Just with the increase in biodiesel price of 2 orders of magnitude, a positive evaluation was obtained with the production of 10 or more kton of biomass per year. However, this price is highly prohibitively when the target is the replacement of petro fuel. The economic parameters calculated as a function of product price 2 orders of magnitude are presented in **Table 8.6**.

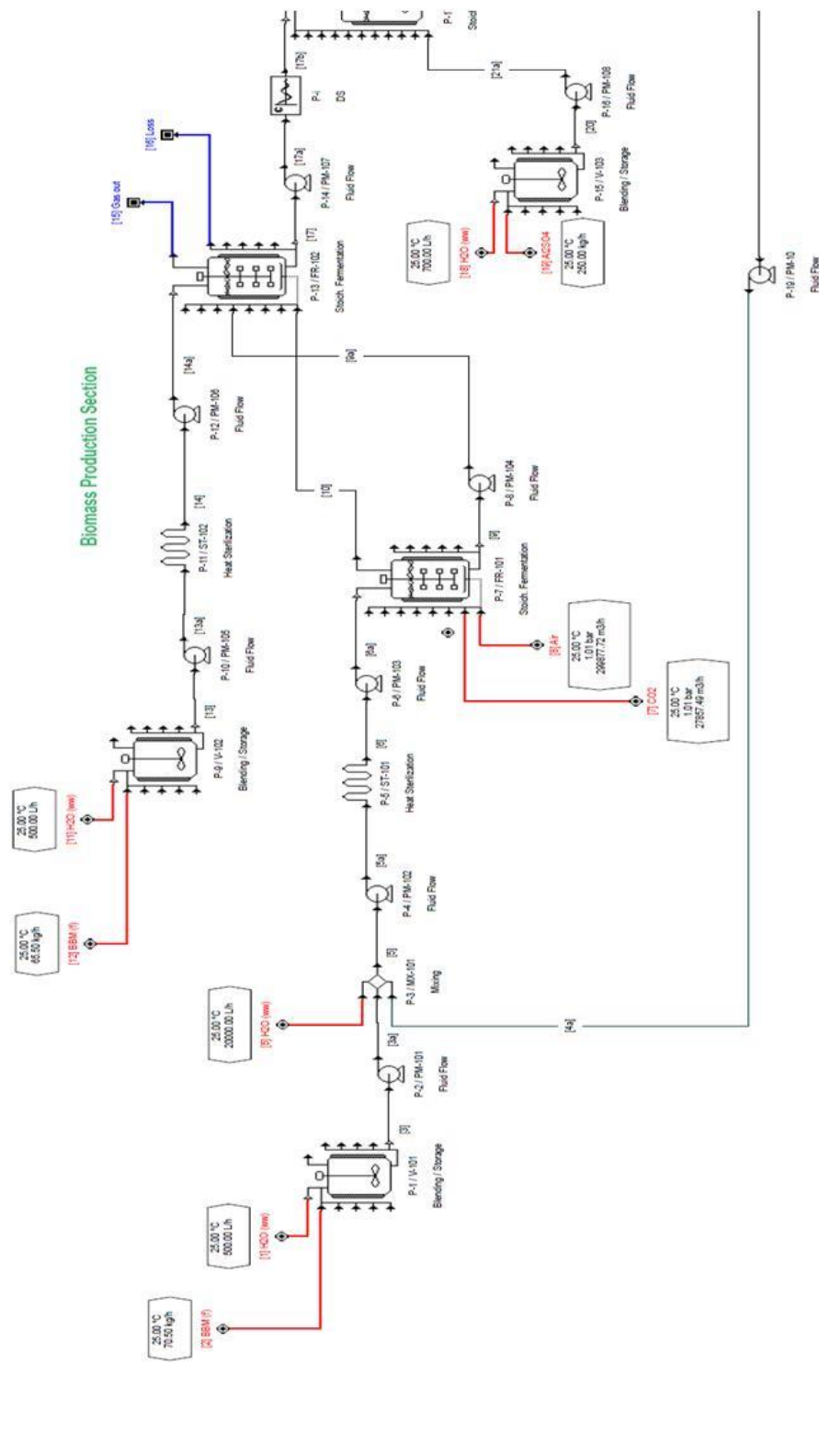


Figure 8.4A: Microalgal biodiesel production

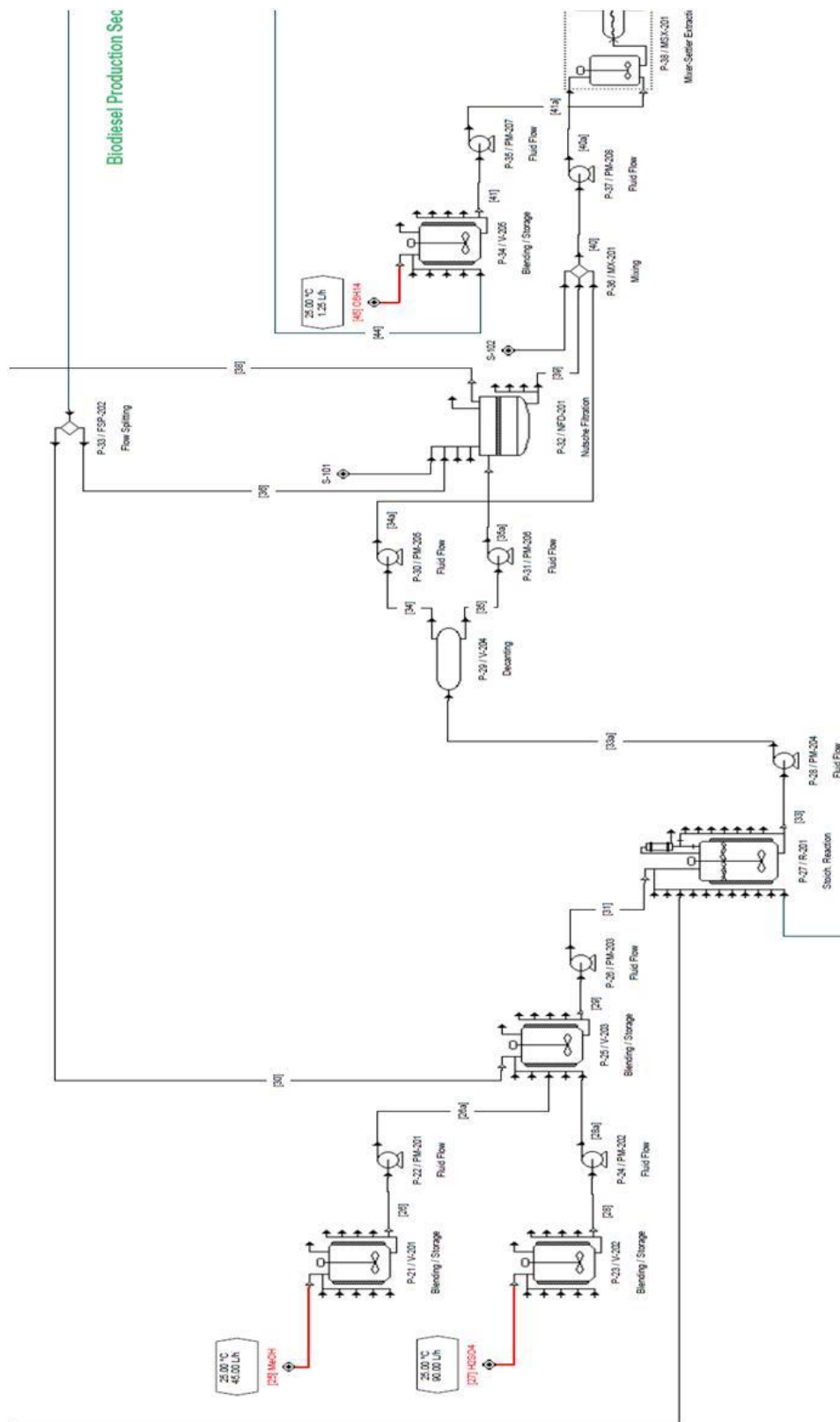


Figure 8.4B: Microalgal biodiesel production

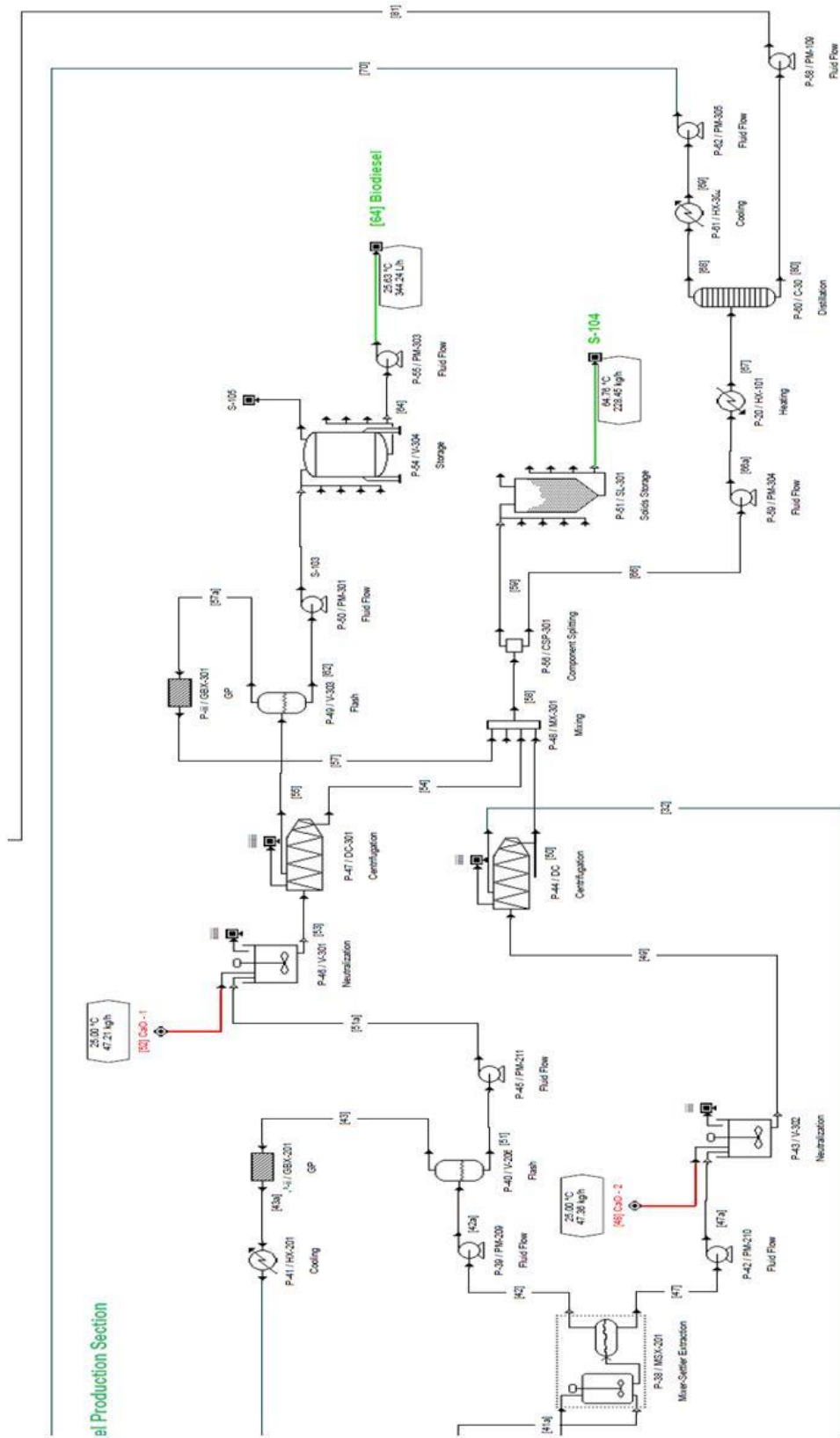


Figure 8.4C: Microalgal biodiesel production

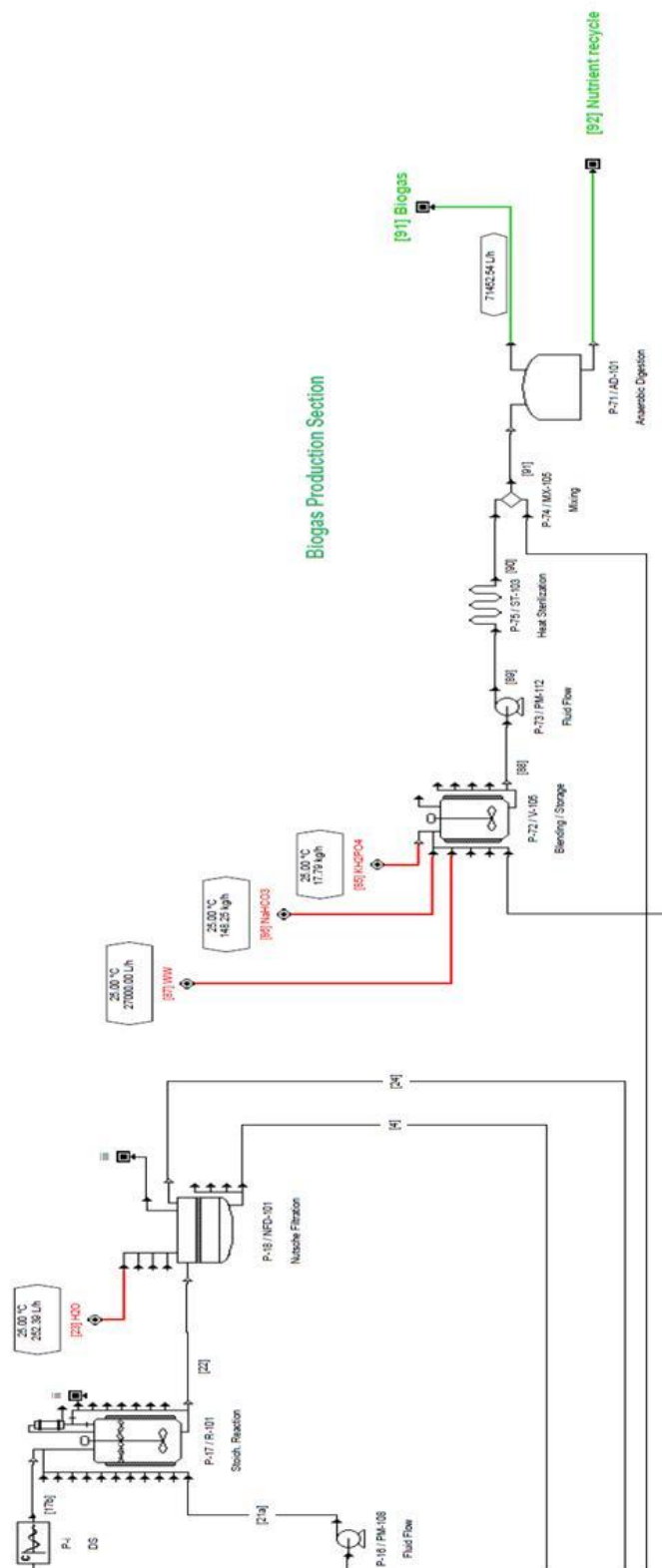


Figure 8.4D: Microalgal biodiesel production

Table 8.5: Economic evaluation summary (2012 prices in \$).

Cost Description	Annual Production Capacity (kTon)				
	1	5	10	15	20
<u>Total Plant Direct Cost (TPDC)</u>					
Equipment Purchase	65,441,000	129,552,000	209,688,000	291,658,000	403,846,000
Installation	29,654,000	54,203,000	84,403,000	115,354,000	161,265,000
Process Piping	22,904,000	45,343,000	73,391,000	102,080,000	141,346,000
Instrumentation	26,176,000	51,821,000	83,875,000	116,663,000	161,539,000
Insulation	1,963,000	3,887,000	6,291,000	8,750,000	12,115,000
Electrical	6,544,000	12,955,000	20,969,000	29,166,000	40,385,000
Buildings	29,448,000	58,298,000	94,359,000	131,246,000	181,731,000
Yard Improvement	9,816,000	19,433,000	31,453,000	43,749,000	60,577,000
Auxiliary Facilities	26,176,000	51,821,000	83,875,000	116,663,000	161,539,000
TPDC	218,123,000	427,313,000	688,303,000	955,330,000	1,324,342,000
<u>Total Plant Indirect Cost (TPIC)</u>					
Engineering	54,531,000	106,828,000	172,076,000	238,832,000	331,085,000
Construction	76,343,000	149,559,000	240,906,000	334,365,000	463,520,000
TPIC	130,874,000	256,388,000	412,982,000	573,198,000	794,605,000
<u>Total Plant Cost (TPC)</u>					
TPC	348,996,000	683,701,000	1,101,285,000	1,528,528,000	2,118,947,000
<u>Contractor's Fee & Contingency (CFC)</u>					
Contractor's Fee	17,450,000	34,185,000	55,064,000	76,426,000	105,947,000
Contingency	34,900,000	68,370,000	110,129,000	152,853,000	211,895,000
CFC	52,349,000	102,555,000	165,193,000	229,279,000	317,842,000
<u>Direct Fixed Capital Cost (DFC = TPC+CFC)</u>					
DFC	401,345,000	786,256,000	1,266,478,000	1,757,807,000	2,436,788,000
<u>Total Investment Cost (TIC = DFC+WC+SC)</u>					
Working Capital (WC)	3,010,000	6,248,000	10,282,000	14,314,000	18,514,000
Startup Cost (SC)	20,067,000	39,313,000	63,324,000	87,890,000	121,839,000
Total Investment	424,423,000	831,816,000	1,340,084,000	1,860,011,000	2,577,142,000
<u>Annual Operating Cost (AOC)</u>					
Raw Material	7,999,000	39,997,000	79,994,000	119,991,000	159,987,000
Labor	20,226,000	20,256,000	20,286,000	20,310,000	20,296,000
Depreciation	38,128,000	74,694,000	120,315,000	166,992,000	231,495,000
Other Facilities	37,343,000	73,265,000	118,093,000	163,957,000	227,251,000
Utilities	4,885,000	8,474,000	12,817,000	17,152,000	23,368,000
AOC	108,581,000	216,686,000	351,506,000	488,402,000	662,397,000

Table 8.6: Economic parameters as function of product price (2012 prices in \$).

Parameters	Annual Production Capacity (kTon)				
	1	5	10	15	20
Revenues (Millions of \$/year)	40,257,402	199,447,484	396,958,489	594,931,807	793,301,634
Revenues - AOC (Millions of \$/year)	-68281598	-17,170,528	44,285,489	106,759,125	130,533,634
NPV 7.0% Interest (Millions of \$)	- 624,815,000	- 413,966,000	- 271,871,000	- 159,875,000	- 296,128,000
ROI (%)	- 7.11	6.91	10.95	12.41	12.01
PBP (years)	N/A	14.48	9.13	8.06	8.32

It is important to highlight that the process used in this study not represent most optimized approach, but it is the process with more data available in literature to perform the simulations.

Unfortunately, the results obtained in this study shows that the economics of large scale microalgae biofuels production cannot compete with fossil fuels. So far, others researches shows the same (BELLO *et al.*, 2012; BRUNET *et al.*, 2012; RIBEIRO e SILVA, 2013; RÍOS *et al.*, 2013). It is important to realize that the petroleum technology is well established because of more than 100 years of continuously research and development, but in the beginning many technological problems were solved to achieve a positive economic analysis.

In this sense, despite of the results of microalgae biofuels still not economic competitive, with our analysis was possible to highlight improvements in the process that needs to be achieved before a large scale microalgal refinery become true and compete with oil refineries:

1. Simulation has several speculative inputs, so, the results presented here intrinsically carry a relatively high degree of uncertainty in terms of processes efficiency, equipment cost, amount of raw materials, % and effectiveness of recycles (water, nutrient, solvent, and catalyst), yield of the reactions, and others. Also that, energy integration was not considered in the simulations.

2. Microalgae biodiversity is huge being estimated more than 200,000 species, but commercial microalgae production still based on traditional microorganisms as: *Spirulina* (3,000 ton/year), *Chlorella* (2,000 ton/year), *Dunaliella* (1,200 ton/year), *Nostoc* (600 ton/year), *Aphanizomenon* (500 ton/year) (PULZ e GROSS, 2004). In this sense, several species can be evaluated yet, and genetic engineering could offer improvements in strain growth, lipid accumulation, photon efficient utilization, product excretion, and agglomeration capacity in stationary phase (WIJFFELS e BARBOSA, 2010).
3. The photobioreactor specified for this analysis consist in a rigid tube system, but others materials such as thin films and hanging bags, must be evaluated to improve light efficiency use, and reduce equipment cost and maintenance. However, improvements in lifetime of these materials also need to be addressed.
4. Develop a new reactor design associated with better gaseous dispersions systems to improve mass transfer between solid-liquid-gaseous phases in terms of nutrient and light availability could improve productivity, reduce gaseous feed, and, consequently, reduce the energy used to pump flue gas into the reactors.
5. Two stages were proposed to improve biomass growth (first) and lipid accumulation (second). However, improve maximum cell concentration in the first stage could leads to better productivities, reducing number of photobioreactors and downstream processing units, as well the cost per kg of algal oil.
6. Improve harvesting techniques developing low cost systems to reduce energy requirements, compounds addition, and consumables needs.
7. Feasible new technologies with high efficiency to use biomass without dewatering process could lead to an important discovery in terms of process energy consumption and economic analysis.
8. Direct transesterification has a reasonable conversion rate with use of a catalyst. However, improvements to achieve low operating cost and

environment friendly process need to be done in terms of: i) use different alcohol such as ethanol; ii) reduce alcohol:catalyst:oil ratio, iii) alternative and efficient methods to maximize alcohol and catalyst recovery; iv) reduce severity of operational conditions (Temperature, pressure, time).

9. The residual biomass can be used in the production of valuable added co-products. Also that, it has an energy value and can be converted into various energy forms, such as biogas, electricity or hydrogen. However, with the volume of depleted biomass, could be not easy to find a value-added co-product with comparable market scale. In this sense, the following approaches can be evaluated to add value to the oil depleted biomass:

- a. Produce other type of biofuels as ethanol with carbohydrate fraction followed by methane with protein fraction. Both can fit with this production scale.
- b. Produce 2 or more co-products to a realistic market scale.
 - i. If biomass production is carried out without residual raw materials, lipids should be fractionated into lipids for biodiesel, lipids as a feedstock for the chemical industry and w-3 fatty acids, proteins and carbohydrates for food, feed and bulk chemicals, and the oxygen produced should be recovered also (WIJFFELS *et al.*, 2010).
 - ii. If residual nutrient, wastewater and CO₂ are used during biomass growth, production of bulk chemicals and fuels should be used (WIJFFELS *et al.*, 2010).

5. Conclusions

Techno economic models were constructed for the *C. vulgaris* cultured in bubble columns photobioreactors with focus on biomass & biodiesel production. It is a first

estimate of the process performance that not represents the most optimized approach, but it is the process with more data available in the literature to perform the simulation. The positive evaluation of the techno-economic analysis leads to the start of plant construction, but, in this case, a negative makes all the work be revised, which demonstrates the importance of this analysis into the context of an industrial plant project.

Despite of the negative economic evaluation, with our analysis was possible to highlight improvements in the process that needs to be achieved before that a large scale microalgal refinery become true and compete with oil refineries. Also, it was possible to conclude that, a multidisciplinary approach will be required, so that future technological advances get leads a drastically improvements in the economics of large scale biofuels production, revealing the full potential of microalgae to replace part of the fossil fuels consumption.

6. Acknowledgement

Funding for this research was provided by the Fundação de Amparo a Pesquisa no Estado de São Paulo, FAPESP (Brazil); Capes; CNPQ and PETROBRAS.

7. Reference

AHMAD, A. L.; YASIN, N. H. M.; DEREK, C. J. C.; LIM, J. K. Microalgae as a sustainable energy source for biodiesel production: A review. **Renewable and Sustainable Energy Reviews**, v. 15, n. 1, p. 584-593, 2011.

BANNISTER, T. T. Quantitative description of steady state, nutrient-saturated algal growth, including adaptation. **Limnol. Oceanogr.**, v. 24, p. 76-96, 1979.

BELLO, B. Z.; NWOKOAGBARA, E.; WANG, M. **Comparative Techno-economic Analysis of Biodiesel Production from Microalgae via Transesterification Methods**. In: IAN DAVID LOCKHART, B. e MICHAEL, F. (Ed.). *Computer Aided Chemical Engineering*: Elsevier, v. Volume 30, 2012. p.132-136.

BRENNAN, L.; OWENDE, P. Biofuels from microalgae--A review of technologies for production, processing, and extractions of biofuels and co-products. **Renewable and Sustainable Energy Reviews**, v. 14, n. 2, p. 557-577, 2010.

BRUNET, R.; CARRASCO, D.; MUÑOZ, E.; GUILLÉN-GOSÁLBEZ, G.; KATAKIS, I.; JIMÉNEZ, L. **Economic and environmental evaluation of microalgae biodiesel production using process simulation tools**. In: IAN DAVID LOCKHART, B. e MICHAEL, F. (Ed.). Computer Aided Chemical Engineering: Elsevier, v. Volume 30, 2012. p.547-551.

CHISTI, Y. Biodiesel from microalgae. **Biotechnology Advances**, v. 25, n. 3, p. 294-306, 2007.

CHISTI, Y. Biodiesel from microalgae beats bioethanol. **Trends in Biotechnology**, v. 26, n. 3, p. 126-131, 2008a.

CHISTI, Y. Response to Reijnders: Do biofuels from microalgae beat biofuels from terrestrial plants? **Trends in Biotechnology**, v. 26, n. 7, p. 351-352, 2008b.

CHOWDHURY, R.; VIAMAJALA, S.; GERLACH, R. Reduction of environmental and energy footprint of microalgal biodiesel production through material and energy integration. **Bioresour Technol**, v. 108, p. 102-11, 2012.

DE PAOLI, F.; BAUER, A.; LEONHARTSBERGER, C.; AMON, B.; AMON, T. Utilization of by-products from ethanol production as substrate for biogas production. **Bioresource Technology**, v. 102, n. 11, p. 6621-6624, 2011.

DEMIRBAS, A. Biodiesel from oilgae, biofixation of carbon dioxide by microalgae: A solution to pollution problems. **Applied Energy**, v. 88, n. 10, p. 3541-3547, 2011.

DRAGONE, G.; FERNANDES, B.; VICENTE, A. A.; TEIXEIRA, J. A. Third generation biofuels from microalgae. 2010.

EHIMEN, E. A.; CONNAUGHTON, S.; SUN, Z.; CARRINGTON, G. C. Energy recovery from lipid extracted, transesterified and glycerol codigested microalgae biomass. **GCB Bioenergy**, v. 1, n. 6, p. 371-381, 2009.

EHIMEN, E. A.; SUN, Z. F.; CARRINGTON, C. G. Variables affecting the in situ transesterification of microalgae lipids. **Fuel**, v. 89, n. 3, p. 677-684, 2010.

EHIMEN, E. A.; SUN, Z. F.; CARRINGTON, C. G.; BIRCH, E. J.; EATON-RYE, J. J. Anaerobic digestion of microalgae residues resulting from the biodiesel production process. **Applied Energy**, v. 88, n. 10, p. 3454-3463, 2011.

GALLAGHER, B. J. The economics of producing biodiesel from algae. **Renewable Energy**, v. 36, n. 1, p. 158-162, 2011.

GECIOVA, J.; BURY, D.; JELEN, P. Methods for disruption of microbial cells for potential use in the dairy industry-a review. **International Dairy Journal**, v. 12, n. 6, p. 541-553, 2002.

GREENWELL, H. C.; LAURENS, L. M. L.; SHIELDS, R. J.; LOVITT, R. W.; FLYNN, K. J. Placing microalgae on the biofuels priority list: a review of the technological challenges. **Journal of The Royal Society Interface**, 2009.

GROBBELAAR, J. Factors governing algal growth in photobioreactors: the “open” versus “closed” debate. **Journal of Applied Phycology**, v. 21, n. 5, p. 489-492, 2009.

HAAS, M. J.; MCALOON, A. J.; YEE, W. C.; FOGLIA, T. A. A process model to estimate biodiesel production costs. **Bioresour Technol**, v. 97, n. 4, p. 671-8, 2006.

HADJ-ROMDHANE, F.; JAOUEN, P.; PRUVOST, J.; GRIZEAU, D.; VAN VOOREN, G.; BOURSEAU, P. Development and validation of a minimal growth medium for recycling *Chlorella vulgaris* culture. **Bioresource Technology**, 2012a.

HADJ-ROMDHANE, F.; JAOUEN, P.; PRUVOST, J.; GRIZEAU, D.; VAN VOOREN, G.; BOURSEAU, P. Development and validation of a minimal growth medium for recycling *Chlorella vulgaris* culture. **Bioresource Technology**, v. 123, n. 0, p. 366-374, 2012b.

ILLMAN, A. M.; SCRAGG, A. H.; SHALES, S. W. Increase in *Chlorella* strains calorific values when grown in low nitrogen medium. **Enzyme and Microbial Technology**, v. 27, n. 8, p. 631-635, 2000.

LACERDA, L. M. C. F.; QUEIROZ, M. I.; FURLAN, L. T.; LAURO, M. J.; MODENESI, K.; JACOB-LOPES, E.; FRANCO, T. T. Improving refinery wastewater for microalgal biomass production and CO₂ biofixation: Predictive modeling and simulation. **J Petrol Sci Eng**, v. 78, n. 3-4, p. 679-686, 2011.

MATA, T. M.; MARTINS, A. A.; CAETANO, N. S. Microalgae for biodiesel production and other applications: A review. **Renewable and Sustainable Energy Reviews**, v. 14, n. 1, p. 217-232, 2010.

MIAO, X.; LI, R.; YAO, H. Effective acid-catalyzed transesterification for biodiesel production. **Energy Conversion and Management**, v. 50, n. 10, p. 2680-2684, 2009.

MOLINA GRIMA, E.; BELARBI, E. H.; ACIÉN FERNÁNDEZ, F. G.; ROBLES MEDINA, A.; CHISTI, Y. Recovery of microalgal biomass and metabolites: process options and economics. **Biotechnology Advances**, v. 20, n. 7-8, p. 491-515, 2003.

NIGAM, P. S.; SINGH, A. Production of liquid biofuels from renewable resources. **Progress in Energy and Combustion Science**, v. 37, n. 1, p. 52-68, 2011.

OLAIZOLA, M. Commercial development of microalgal biotechnology: from the test tube to the marketplace. **Biomolecular Engineering**, v. 20, n. 4-6, p. 459-466, 2003.

OLTRA, C. Stakeholder perceptions of biofuels from microalgae. **Energy Policy**, v. 39, n. 3, p. 1774-1781, 2011.

PETERS, M. S.; TIMMERHAUS, K.; WEST, R. E. Plant design and economics for chemical engineers: McGraw-Hill Higher Education 2003.

PULZ, O.; GROSS, W. Valuable products from biotechnology of microalgae. **Appl Microbiol Biotechnol**, v. 65, n. 6, p. 635-48, 2004.

RIBEIRO, L. A.; SILVA, P. P. D. Surveying techno-economic indicators of microalgae biofuel technologies. **Renewable and Sustainable Energy Reviews**, v. 25, n. 0, p. 89-96, 2013.

RICHMOND, A. **Handbook of microalgal culture : biotechnology and applied phycology**. Blackwell Science Ltd, 2004.

RÍOS, S. D.; TORRES, C. M.; TORRAS, C.; SALVADÓ, J.; MATEO-SANZ, J. M.; JIMÉNEZ, L. Microalgae-based biodiesel: Economic analysis of downstream process realistic scenarios. **Bioresource Technology**, v. 136, n. 0, p. 617-625, 2013.

SIALVE, B.; BERNET, N.; BERNARD, O. Anaerobic digestion of microalgae as a necessary step to make microalgal biodiesel sustainable. **Biotechnology Advances**, v. 27, n. 4, p. 409-416, 2009.

SINGH, J.; GU, S. Commercialization potential of microalgae for biofuels production. **Renewable and Sustainable Energy Reviews**, v. 14, n. 9, p. 2596-2610, 2010.

STEIN, J. R. **Handbook of phycological methods. Culture methods and growth measurements**. London: Cambridge University Press, 1973. 1-448

SUALI, E.; SARBATLY, R. Conversion of microalgae to biofuel. **Renewable and Sustainable Energy Reviews**, v. 16, n. 6, p. 4316-4342, 2012.

SUN, A.; DAVIS, R.; STARBUCK, M.; BEN-AMOTZ, A.; PATE, R.; PIENKOS, P. T. Comparative cost analysis of algal oil production for biofuels. **Energy**, v. 36, n. 8, p. 5169-5179, 2011.

WIJFFELS, R. H.; BARBOSA, M. J. An outlook on microalgal biofuels. **Science**, v. 329, n. 5993, p. 796-9, 2010.

WIJFFELS, R. H.; BARBOSA, M. J.; EPPINK, M. H. M. Microalgae for the production of bulk chemicals and biofuels. **Biofuels, Bioproducts and Biorefining**, v. 4, n. 3, p. 287-295, 2010.

ZAMALLOA, C.; BOON, N.; VERSTRAETE, W. Anaerobic digestibility of *Scenedesmus obliquus* and *Phaeodactylum tricornutum* under mesophilic and thermophilic conditions. **Applied Energy**, v. 92, p. 733-738, 2012.

ZAMALLOA, C.; VULSTEKE, E.; ALBRECHT, J.; VERSTRAETE, W. The techno-economic potential of renewable energy through the anaerobic digestion of microalgae. **Bioresource Technology**, v. 102, n. 2, p. 1149-1158, 2011.

CAPÍTULO 9

CONCLUSÕES

Conclusões

As condições que maximizam o crescimento celular, a mitigação de CO₂, o acúmulo de lipídios e proporcionam um perfil de ácidos graxos, compatível com a produção de biodiesel de elevada qualidade, foram avaliadas em função de diferentes temperaturas (18-42 °C), disponibilidade de carbono na forma de CO₂ (ar-40%), disponibilidade de luz (4-192 μmol.m⁻².s⁻¹) e disponibilidade de nitrogênio na forma de NaNO₃ (0,25-1,00 g.L⁻¹). A recuperação da biomassa a partir do processo de floculação foi avaliada em função do tipo de floculante (orgânico e inorgânico), dose do floculante (0,005-0,300 g.L⁻¹), pH (4-11) e concentração celular (0,1-1,0 g.L⁻¹).

As melhores condições de cultivo selecionadas foram: 108 μmol.m⁻².s⁻¹, 26,5 °C, 0,25 g.L⁻¹ de NaNO₃ e 8,05 % de CO₂, sendo obtidos os seguintes resultados: $X_{\max}/X_0=14,78$; $\mu_{\max}=1,02d^{-1}$; $\lambda=0,50d$; $P_{\max}=0,58g.L^{-1}.d^{-1}$; $P_{\text{mean}}=0,31 g.L^{-1}.d^{-1}$; $CB_{\max}=1,06 g.L^{-1}.d^{-1}$; $CB_{\text{mean}}=0,55 g.L^{-1}.d^{-1}$, 50% de lipídios e 90% dos FAMES correspondendo aos principais FAMES do biodiesel (C16:0, C18:0, C18:1, C18:2 e C18:3).

A predição da qualidade do biodiesel produzido a partir do óleo de microalga forneceu os seguintes resultados: CN=56, CFPP = 0,8°C, $\rho = 863kg/m^3$, $II = 97 g_{I_2}/100g$, $\Delta HC = 39,2 kJ/g$, OSI = 13,8h, e $\mu = 3,93mm^2.s$ estando dentro dos valores especificados pelas normas ANP255/2003, EN14213-14214 e ASTM6751.

As condições para eficiências de recuperação da biomassa superiores a 95% foram: intervalos de pH 4,0 à 11,0 (floculante orgânico); 5,0 à 7,0 (FeCl₃) e de 7,0 a 8,0 (Al₂(SO₄)₃; razão de $g_{\text{floculante}}/g_{\text{biomassa}}$ de: 0,08 $g_{\text{orgânico}}/g_{\text{biomassa}}$, 0,40 $g_{Al_2(SO_4)_3}/g_{\text{biomassa}}$.

O impacto da disponibilidade de luz no interior de fotobiorreatores foi estimada para diferentes disponibilidades de luz (108-700 μmol.m⁻².s⁻¹) e a partir de dados de concentração celular, concentração de pigmentos e geometria do reator, sendo verificada a perda de aproximadamente 85% da luz disponível na superfície para

cultivos com concentração celular de até 2 g.L^{-1} em fotobiorreatores de 8 cm de diâmetro.

A análise econômica da produção de biodiesel de microalga foi avaliada, contudo as simulações apresentadas contêm um relativo grau de incerteza visto que parte dos dados correspondem a valores especulativos, sendo eles: i) eficiência dos processos, custo dos equipamentos, quantidade das matérias primas, efetividade dos ciclos (água, nutrientes, solventes, catalisador), rendimento das reações, dentre outros.

Apesar de fortemente negativa, a análise econômica evidenciou os pontos do processo que ainda necessitam ser melhorados: i) estudos de outras cepas ou mesmo o uso de cepas geneticamente modificadas, ii) uso de novas configurações de fotobiorreatores (design e material de construção), iii) obtenção de culturas mais concentradas, iv) estudos de outras técnicas de separação que consumam menos energia e minimizem o uso de agentes externos, bem como os efeitos desses agentes no ciclo do meio de cultura, v) desenvolvimento de tecnologias para uso da microalga sem a necessidade de separação do meio e secagem, vi) melhorias no processo de transesterificação direta (uso de solventes menos agressivos ao meio ambiente, redução da severidade das condições de reação, redução da razão solvente/catalisador/óleo, vii) estabelecimento de usos para a biomassa residual da produção de biodiesel que sejam economicamente viáveis e que se adéquem as atuais necessidades de mercado.

Nesse sentido, novas tecnologias devem ser desenvolvidas para que a viabilidade econômica desse processo se torne real e biocombustíveis de microalgas possam reduzir o consumo de combustíveis fósseis de forma competitiva econômica e tecnologicamente.

CAPÍTULO 10

SUGESTÕES PARA TRABALHOS FUTUROS

Sugestões para trabalhos futuros

Avaliar outras cepas de microalgas, bem como o uso de adaptação por pressão evolutiva ou mesmo engenharia genética para obtenção de cepas com melhores características de acúmulo de lipídios, crescimento celular e taxa de sedimentação.

Avaliar outras configurações de reatores (placas paralelas, airlift, dentre outros) bem como múltiplos pontos de adição de gases para melhorar a produtividade dos cultivos.

Estudos e outros materiais para produção dos biorreatores visando redução de custo, melhoria na eficiência de uso da luz, dentre outros parâmetros.

Verificar o impacto de outras fontes de carbono (NaHCO_3 , fontes orgânicas) e nitrogênio (uréia, KNO_3 , dentre outros) no cultivo de microalgas.

Avaliar novas formas de estresse celular para maximizar o acúmulo de lipídios sem que o crescimento celular seja influenciado, ou que essa influência seja inferior à apresentada pela limitação de nitrogênio.

Testar processos de transesterificação direta que utilizem a biomassa úmida para excluir o processo de secagem e permitir que o processo de separação de biomassa seja mais brando.

Otimizar a recuperação dos produtos para maximizar o aproveitamento da biomassa. Por exemplo, testar a produção de biodiesel (fração lipídica), etanol (fração de carboidratos) e biogás (fração protéica), reaproveitando o efluente líquido e gasoso para diminuir os gastos com matéria-prima.

Minimizar a geração de resíduos, maximizando os ciclos e otimizando as tecnologias para que a necessidade de solventes, catalizadores, agentes externos seja reduzida.

Construir e operar uma planta piloto para produção de biomassa, verificando a estabilidade do processo e o efeito do *scale up*.

Verificar a possibilidade de recuperar produtos de elevado valor agregado antes do processo de transesterificação.

CAPÍTULO 11

APENDICE



XVIII Congresso Brasileiro de Engenharia Química COBEQ, Foz do Iguaçu, 2010

Análise da viabilidade energético ambiental da conversão de dióxido de carbono por microalgas em fotobiorreatores

Scoparo, C.H.G.¹, Lacerda, L.M.C.F.¹, Jacob-Lopes, E.² e Franco, T.T.¹

¹Universidade Estadual de Campinas, Faculdade de Engenharia Química
e-mail: crlshenrique@yahoo.com.br

²Universidade Federal de Pelotas, Faculdade de Engenharia Agrícola
e-mail: jacob.lopes@ufpel.edu.br

RESUMO – O aquecimento global gerou uma crescente preocupação com o meio ambiente. A fixação biológica é uma das formas de redução da concentração de CO₂, um dos possíveis causadores desse problema. Com esse objetivo, foi realizada a análise de viabilidade energético-ambiental do processo industrial de conversão de CO₂ e produção de biocombustíveis por cianobactérias. Baseado em dados experimentais e de literatura foi proposta uma planta industrial integrada para remoção de CO₂, produção de gás e óleo para fabricação de biogás e biodiesel, respectivamente. Considerando dados laboratoriais de produção de biomassa e o escopo desse processo de produção de biocombustíveis foram calculados os balanços de massa e energia para o estudo de caso da utilização de todo o CO₂ gerado pela refinaria de Paulínia (Replan/PETROBRAS). Os resultados demonstraram que o sistema é capaz de gerar mais energia do que consome durante sua operação podendo ser utilizado como fonte de energia limpa, na qual o ciclo de carbono se completa, não havendo emissão líquida de CO₂ para a atmosfera.

PALAVRAS-CHAVE: Dióxido de carbono, cianobactérias, análise energética

1. INTRODUÇÃO

O aquecimento global é uma preocupação mundial, sendo atualmente atribuído às elevadas concentrações de dióxido de carbono e outros gases do efeito estufa na atmosfera (Halsnaes & Traerup, 2009; IPCC, 2007; Tomkiewicz, 2006; Kessel, 1999). Assim, políticas ambientais têm sido desenvolvidas visando a redução das emissões desses compostos, sendo o protocolo de Kyoto o mais importante deles e objetivando uma redução de 5,2% em relação às emissões de 1990 (Kyoto Protocolo, 1997). Dentre as principais formas de mitigação

desse composto está a fixação biológica, pois trata-se de um processo fotossintético em que o dióxido de carbono é incorporado na forma de biomassa (Wang et al., 2008) que pode ser utilizada em diversos ramos industriais para produção de energia ou obtenção de compostos de elevado valor comercial, como, por exemplos, biofertilizante, rações para animais, pigmentos (corantes) e proteínas (Jacob-Lopes et al., 2010).

Por outro lado, a capacidade heterotrófica das cianobactérias pode ser utilizada como base do tratamento de efluentes líquidos que contenham nutrientes e

carbono orgânico na ausência de luz (Muñoz & Guieysse, 2006), de forma que a combinação dos metabolismos autotrófico e heterotrófico pode resultar em processos que utilizam fontes baratas de nutrientes (efluentes industriais líquidos e gasoso).

A avaliação das variáveis de desempenho ambiental é de extrema importância para o desenvolvimento de processos industriais que utilizem essa tecnologia de sequestro de carbono por cianobactérias. Em face disto, este trabalho objetivou estudar a viabilidade energético-ambiental da implantação de uma planta industrial de sequestro de dióxido de carbono por cultivo fotossintético da cianobactéria *Aphanothece microscopica* Nægeli em efluente líquido e gasoso da indústria petroquímica.

2. MATERIAL E MÉTODOS

2.1. Microorganismo, Manutenção e Propagação do Inoculo

A espécie utilizada foi a *Aphanothece microscopica* Nægeli (RSMAN92), originalmente isolada da Lagoa dos Patos, no estado do Rio Grande do Sul, Brasil (32°01'S - 52°05'W). As culturas foram propagadas e mantidas em meio sintético BGN (Ripka et al., 1979) com a composição apresentada pela tabela 1 e pH 8.0.

Tabela 1: Composição do meio BGN.

Composto	Valor (mg/L)	Composto	Valor (mg/L)
CaCl ₂ .6H ₂ O	0,04	Acido Cítrico	6,0
CuSO ₄ .5H ₂ O	0,08	Na ₂ CO ₃	20,0
ZnSO ₄ .7H ₂ O	0,22	K ₂ PO ₄	30,0
Na ₂ MoO ₄ .2HO	0,39	CaCl ₂ .2H ₂ O	36,0
Na ₂ EDTA	1,00	NaCl	72,0

MnCl ₂ .4H ₂ O	1,81	MgSO ₄ .7H ₂ O	75,0
H ₃ BO ₃	2,86	NaNO ₃	1500,0
		Citrato de amônio e ferro(III)	6,00

As condições de manutenção usadas foram 25°C, intensidade luminosa de 15µmol.m⁻².s⁻¹ e fotoperíodo de 12h.

2.2. Aparato Experimental

Os experimentos foram conduzidos em um reator do tipo coluna de bolhas construído em vidro de 4mm de espessura, 7cm de diâmetro interno, 70cm de altura, 2,4L de volume nominal de trabalho e a dispersão de ar consistindo em um difusor de 7cm de diâmetro que está localizado na base do fotobiorreator. A iluminação foi continuamente fornecida por 16 lâmpadas fluorescentes de 40W, conectadas em paralelo, localizadas em uma câmara de fotoperíodo. A alimentação dos gases foi de 1VVM provida através de ar comprimido e um cilindro de CO₂ industrial. A mistura ar/CO₂ foi controlada por 3 rotâmetros que medem a vazão de dióxido de carbono, ar e a mistura entre os gases respectivamente.

2.3. Experimentos

As condições experimentais foram 30°C, 15%CO₂, 150µmol.m⁻².s⁻¹ de intensidade luminosa com fotoperíodo de 12h, concentração inicial de inóculo de 100 mg/l e o meio de cultura utilizado foi o efluente líquido da indústria de refino de petróleo enriquecido com 25% da quantidade de sais correspondentes ao mesmo volume de meio padrão BGN (Ripka et al., 1979).

As condições experimentais foram determinadas visando a aplicação do processo em cultivo outdoor, ou seja, fotoperíodo de 12 horas (12 horas de escuro e 12 horas de

claro) para viabilizar a operação usando luz solar, temperatura correspondente à temperatura média verificada durante o ano na estação de tratamento de efluente da refinaria de petróleo e a porcentagem de CO₂ na alimentação gasosa que representa aproximadamente a composição industrial de efluentes gasosos ricos em CO₂.

A concentração celular foi monitorada a cada 12h em um período de 156h de tempo de residência e avaliada gravimetricamente pela filtração de um volume conhecido de meio através de um filtro de 0,45µm e seco a 60°C por 24 horas. O fluxo luminoso foi determinado usando um luxímetro digital (Spectronics, modelo XRP3000), medindo a luz incidente na superfície externa do reator. A temperatura foi controlada usando termostatos e medida através de um sensor polarográfico (Mettler Toledo, InPro5000). O fluxo de gases foi determinado usando rotâmetros (AFSG 100 Key Instruments). Os testes foram conduzidos em duplicata para garantir a validade dos resultados.

2.4. Planta Industrial

Baseando-se em dados da literatura, foi proposta uma planta industrial de seqüestro de CO₂ com subsequente produção de biocombustíveis. A partir dos dados coletados no experimento de cultivo em batelada realizado em escala laboratorial e aplicando modelagem matemática adequada para o crescimento da biomassa (Kayombo et al., 2003), foi possível a realização dos balanços de massa e energia do sistema industrial proposto.

3. RESULTADOS E DISCUSSÕES

3.1. Experimentos em Escala Laboratorial

A partir dos dados de crescimento da biomassa obteve-se que a máxima produtividade volumétrica alcançada foi de 16,55 mg/l/h em 78 horas do cultivo em batelada, o que corresponde a uma concentração de biomassa de 920 mg/l e uma velocidade específica de crescimento de 0,0179 h⁻¹. Assim, para obter a máxima produtividade, pode-se afirmar que um reator contínuo correspondente deverá ser operado com taxa de diluição igual a 0,0179 h⁻¹, de forma a manter a concentração dentro do reator constantemente em 920 mg/L. A produtividade esperada para este reator será de 16,55 mg/l/h com subsequente conversão de 0,19% (em massa) de CO₂ em biomassa.

3.2. Processo Industrial Proposto

O processo industrial de cultivo de microalgas para a produção de biocombustíveis proposto a partir de dados coletados na literatura está representado na Figura 1, podendo ser dividido em quatro etapas que devem ser operadas em modo contínuo.

O balanço de massa do processo mostrou que tomando como base de cálculo a emissão de CO₂ da Refinaria de Petróleo Replan (58,5 m³/s, consultado em PETROBRAS, 2005) é possível produzir 0,0129 kg/s de óleo e 0,0474 m³/s de biogás.

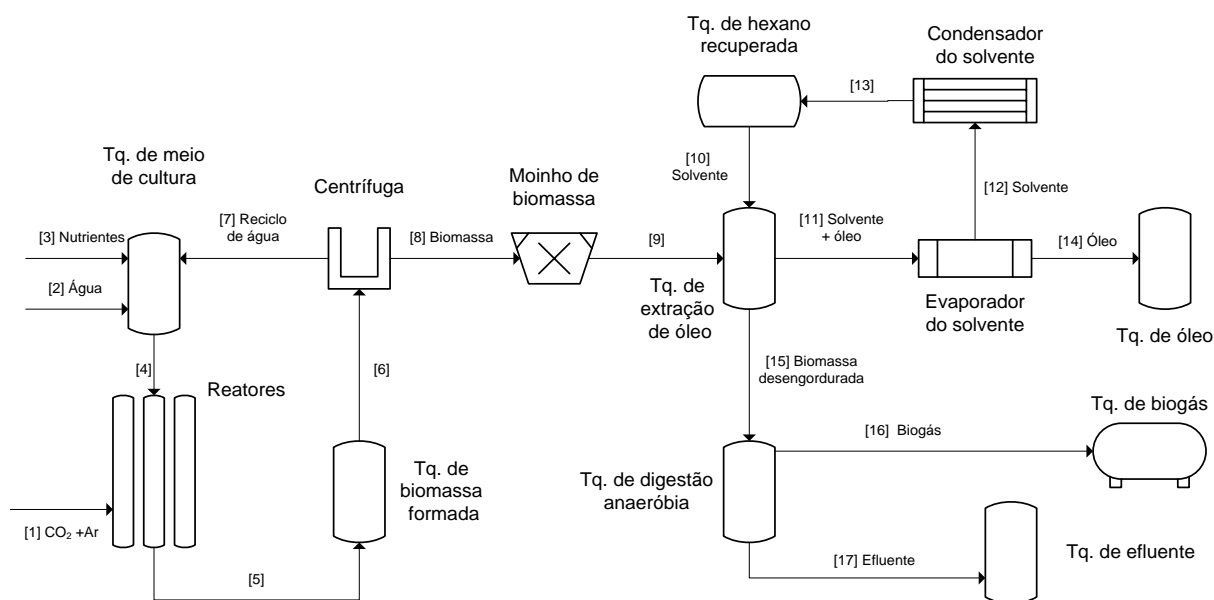


Figura 1: Fluxograma do processo de cultivo de microalgas visando a produção dos biocombustíveis biodiesel e biogás

Etapa 1 - Cultivo da microalga: O cultivo da biomassa ocorrerá em fotobiorreatores de coluna de bolha alimentados continuamente com uma mistura de ar e CO₂ (Corrente 1) obtido em fontes industriais ricas neste gás. Exemplos de fontes de CO₂ para este processo são refinarias de petróleo e usinas termoeletricas, nas quais muitas correntes de efluente gasoso apresentam teor de CO₂ igual a 15% (Maeda et al., 1995), que é um valor verificado como ideal para o cultivo fotossintético de muitas microalgas, inclusive a espécie utilizada neste estudo (Jacob-Lopes et al., 2008).

Meio de cultura é adicionado nos fotobiorreatores através da Corrente 4. O meio de cultura proposto para o processo é o mesmo utilizado nos experimentos de laboratório (efluente líquido tratado proveniente da indústria de refino de petróleo suplementado com 25%, em massa, de cada um dos sais presentes no meio de cultura sintético BGN). A utilização de efluentes (gasoso e líquido) no processo, além do impacto ambiental positivo, tem o efeito de

baratear o processo e torná-lo mais viável, dado o custo inexpressivo, ou mesmo inexistente, da utilização destes rejeitos industriais.

Os fotobiorreatores de coluna de bolhas serão operados em paralelo e aproveitando a luz solar. Durante a noite, devido à ausência de luz, a taxa fotossintética é zerada, porém o crescimento das microalgas pode ser sustentado pela utilização das fontes de carbono orgânico presentes no efluente através do metabolismo heterotrófico. De fato, diversos microrganismos, entre eles algumas microalga podem alternar entre o metabolismo autotrófico (fotossintético) e o metabolismo heterotrófico (Villasclara et al., 1996).

Etapa 2: Recuperação da biomassa: A mistura composta por meio de cultura e biomassa que deixa os fotobiorreatores (Corrente 5) é enviada a um tanque e na sequência a biomassa é separada em uma centrífuga. A corrente líquida obtida (Corrente 7) é retornada ao tanque de preparo

de meio de cultura, onde os nutrientes são adicionados para posterior envio ao conjunto de fotobiorreatores. A biomassa concentrada obtida (Corrente 8) pode então ser enviada para a etapa de extração de óleo.

Etapa 3: Extração do óleo: A biomassa recuperada (Corrente 8) é então preparada para a extração do óleo, sendo enviada para o tanque de moagem que promove, mecanicamente, a lise das células e conseqüente liberação do óleo para o meio externo. A biomassa já moída (Corrente 9) é então direcionada para o tanque de extração, onde a mesma entra em contato com o solvente hexano, que por ter afinidade pelo óleo produzido das células, promove a sua extração. Trata-se, portanto, de um processo de separação líquido-líquido tradicionalmente utilizado para a obtenção de óleos vegetais (milho, soja, etc.).

A fase rica em hexano contendo o óleo extraído é pouco imiscível com a fase aquosa contendo o restante da biomassa e apresenta grande diferença de densidade com a água, o que permite a fácil separação das fases. Duas correntes deixam, então, o tanque de extração: uma rica em hexano (Corrente 11) e outra (Corrente 15) composta basicamente de água e da biomassa cujo óleo foi extraído (biomassa desengordurada).

O solvente (hexano) presente na Corrente 11 é evaporado no evaporador, o que resulta em uma corrente de óleo para ser comercializado (Corrente 14) que é destinado para tanques de armazenamento e uma corrente de solvente evaporado (Corrente 12). O solvente evaporado é recuperado no processo por um condensador e direcionado para o tanque de solvente, que alimenta novamente o extrator. O solvente, portanto é operado em ciclo fechado.

A biomassa desengordurada é então enviada para o processo de digestão anaeróbia para a produção de biogás.

Etapa 4: Produção do biogás: A biomassa desengordurada (Corrente 15) é enviada para o tanque de digestão, onde ocorre a sua degradação pela adição de calor, com conseqüente liberação de uma mistura gasosa rica em metano, conhecida como biogás (Corrente 16), que pode ser utilizada para a produção de energia.

A porção da biomassa que não é degradada no processo de digestão (Corrente 17), chamada aqui de efluente, contém praticamente todos os nutrientes inorgânicos (principalmente nitrogênio e fósforo) adicionados no tanque de meio de cultura através da Corrente 3. Por essa razão o co-produto efluente pode ser vendido como fertilizante para o solo.

3.3. Balanço Energético-Ambiental para o Processo Industrial Proposto

O processo industrial proposto tem por objetivo, além do sequestro de carbono promovido pelo crescimento da biomassa, a produção dos biocombustíveis biodiesel (a partir do óleo extraído da biomassa) e biogás (composto principalmente de metano). Para ter uma base de comparação consistente entre os métodos de geração de combustíveis, pode-se trabalhar com todas as vazões de produtos em função de seu conteúdo energético (quantidade de energia que é liberada quando se utiliza o combustível em questão). Encarando o processo industrial proposto como um processo de geração de energia, espera-se que a energia equivalente liberada pelos produtos seja superior à energia gasta para gerar os produtos. Assim, tem-se o conceito de razão de consumo de energia, R, (Tsukahara e Sawayama, 2005):

$$R = \frac{E_{gasta}}{E_{obtida}}, \quad (1)$$

onde E_{gasta} é a energia total gasta para produzir o combustível e E_{obtida} é a energia contida no combustível formado. Logo, um processo de obtenção de combustíveis é eficiente, e viável, apenas quando sua razão de consumo de energia é menor que 1.

Para o cálculo da razão de consumo de energia do processo industrial proposto foram quantificados todos os gastos energéticos necessários para sua operação (bombas, agitadores, aquecimento, etc.) e o conteúdo energético dos biocombustíveis produzidos.

Os valores obtidos para gastos energéticos e obtenção de energia no sistema estão detalhados nas Tabelas 2 e 3. Observa-se, pelos valores reportados nas Tabelas 1 e 2, que a energia contida nos produtos gerados supera em 463 kJ/s a energia gasta para operar o processo, o que resulta em uma razão de consumo de energia igual a 0,73. O processo proposto, portanto, é viável do ponto de vista energético e pode ser utilizado como fonte de biocombustíveis. No balanço energético realizado acima não foram considerados os gastos energéticos para a construção da unidade industrial.

Os processos de produção de biocombustíveis que apresentam razão de consumo de energia menor que 1 podem ser considerados ambientalmente neutros em relação às emissões de CO_2 , pois apesar de

seu processo de queima (liberação da energia acumulada nas moléculas de biocombustível) liberar CO_2 para a atmosfera, houve inicialmente um processo de seqüestro de CO_2 da atmosfera durante o cultivo fotossintético, fechando o ciclo e zerando a emissão líquida de CO_2 .

A utilização de biocombustíveis é, de maneira indireta, a utilização da energia solar acumulada nas moléculas do organismo fotossintético através da fotossíntese. A queima libera esta energia acumulada e devolve para a atmosfera CO_2 que havia sido seqüestrado.

4. CONCLUSÕES

O estudo da análise de viabilidade energético-ambiental da planta de fixação de carbono, com subsequente produção de biocombustíveis, através do cultivo da microalga *Aphanothece microscopica Nægeli* em fotoperíodo de 12 horas em fotobiorreatores de coluna de bolhas demonstrou que o sistema é capaz de produzir mais energia do que consome durante o processo produtivo. Pode, portanto, ser utilizado como fonte de energia limpa, na qual o ciclo de carbono se completa e não há emissão líquida de CO_2 para a atmosfera.

5. AGRADECIMENTOS

Agradecemos à PETROBRAS, FAPESP, CAPES e CNPQ.

Tabela 2: Consumo de energia no processo industrial proposto

Equipamento/Componente	Potência requerida (kJ/s)
Bomba de água para o tq de meio de cultura	7,815
Bomba de meio + biomassa para o filtro prensa	14,279
Bomba de biomassa para o tq. de moagem	0,060
Bomba de biomassa moída para a extração	0,157
Bomba de óleo + hexano o evaporador	0,395
Bomba de hexano para o extrator	0,209
Bomba de hexano para o tq. de estocagem	0,183
Bomba de óleo para o tq de estocagem	0,003
Bomba de biom. desengordurda para a digestão	0,192
Bomba de efluente para o tanque de armazenamento	0,024
Agitador do tanque de meio de cultura	3,400
Agitador do tanque de moagem	3,400
Agitador do tanque de digestão anaeróbia	3,400
Consumo de nitrogênio	397,4
Consumo de fósforo	2,251
Centrífuga	377,3
Compressor de Biogás	7,895
Evaporador de Hexano	245,632
Aquecimento do tanque de digestão	146,909
Total	1210,857

Tabela 3: Energia total obtida nos produtos

Produto	Vazão	Conteúdo energético***	Energia Total obtida (kJ/s)
Óleo	*0,0129 kg/s	37900 kJ/kg	489,6
Biogás	**0,0474 m ³ /s	25000 kJ/m ³	1184,3
Total			1673,9

*Considerando 12% de óleo na biomassa seca;

** Considerando que a câmara de digestão da biomassa desengordurada é capaz de gerar 0,5 m³ de biogás (metano principalmente) para cada 1 kg de biomassa desengordurada (base seca) (Chisti, 2008);

***Valores obtidos em Chisti, 2008

6. REFERÊNCIAS

- CHISTI, Y. Response to Reijnders: Do Biofuels from microalgae beat biofuels from terrestrial plants? *Trends in Biotechnol.*, v. 26, 2008.
- HALSNAES, K.; TRAERUP, S. Development and Climate Change: A mainstreaming approach for assessing economic, social, and environmental impacts of adaptation measures. *Environ. Manage.*, v. 43, p. 765-778, 2009.
- IPCC, Intergovernmental Panel on Climate Change. Carbon dioxide capture and storage. Disponível em: <http://www.ipcc.ch/>, 2007. (Acessado em 15/08/2008).
- JACOB-LOPES, E.; LACERDA, L. M. C. F.; FRANCO, T.T. Biomass production and carbon dioxide fixation by *Aphanothece microscopica* Nägeli in a bubble column photobioreactor. *Biochem. Eng. J.*, v. 40, p. 27-34, 2008.
- JACOB-LOPES, E.; SCOPARO, C.H.G.; FRANCO, T.T. Biotransformations of carbon dioxide in photobioreactors. *Energy Convers. Manage.*, v.51, p.894-900, 2010.
- KAYOMBO, S.; MBWETTE, T.S.A.; KATIMA, J.H.Y.; JORGENSEN, S.E. Effects of substrate concentration on the growth of heterotrophic bacteria and algae in secondary facultative ponds. *Water Res.*, v.37, p.2937-2943, 2003.
- KESSEL, D.G. Global warming- facts, assessment, countermeasures. *J. Petrol Sci. Eng.*, v.26, p.157-168, 2000.
- KYOTO PROTOCOL TO THE UNITED NATIONS FRAMEWORK CONVENTION ON CLIMATE CHANGE, 1998. Disponível em: <http://www.mct.gov.br/index.php/content/view/28739.html>. Acessado em: Acessado em 15/08/2008).
- MAEDA, K.; OWADA, M.; KIMURA, N.; OMATA, K.; KARUBE, I. CO₂ fixation from the gas on coal-fired thermal power plant by microalgae. *Energy Convers. Manage.*, v.36, p.717-720, 1995.
- MUÑOZ, R., GUIEYSSE, B. Algal-bacterial processes for the treatment of hazardous contaminants: A review. *Water Res.*, v.40, p.2799-2815, 2006.
- PETROBRAS. (2005), Gestão de emissões atmosféricas: relatório de desempenho. Rio de Janeiro. 35p. Disponível em <http://www2.petrobras.com.br/meioambiente/portugues/pdf/131205VersaoFinalPetrobrasInternet.pdf>. (Acessado em 15/08/2008).
- RIPPKA, R., DERUELLES, J., WATERBURY, J.B., HERDMAN, M., STANIER, R.Y. Generic assignments strain histories and properties of pure cultures of cyanobacteria. *J. Gen. Microbiol.*, v.111, p.1-61, 1979.
- TOMKIEWICZ, M. Global warming: science, money and self-preservation. *C.R. Chimie*, v.9, p.172-179, 2006.
- TSUKAHARA, K.; SAWAYAMA, S. Liquid Fuel Production Using Microalgae. *J. Jpn. Petrol. Ins.*, v.48, p. 251-259, 2005.
- VILLASCLARAS, S.S.; SANCHÓ, A.E.M.; CABALLERO, M.T.E.; PÉREZ, A.D. Production of Microalgae from Olive Mill Wastewater. *Int. Biodeter. & Biodegr.* p.245-247, 1996.
- WANG, B., LI, Y., WU, N., LAN, C.Q. CO₂ bio-mitigation using microalgae. *Appl. Microbiol Biotechnol*, v.79, p.707-718, 2008.



BBEST

1st

Brazilian
BioEnergy
Science and
Technology
Conference

Campos do Jordão - August 14th to 18th, 2011

***1st Brazilian BioEnergy Science and
Technology Conference BBEST, Campos do
Jordão, 2011***

Photobioreactors: biomass production and CO₂ mitigation

Lucy Mara Cacia Ferreira Lacerda¹, Carlos Henrique Gimenes Scoparo¹, Mônica Regina Piovani¹, Eduardo Jacob-Lopes^{1,2}, Telma Teixeira Franco¹

1 - UNICAMP, Brazil. 2 - UFSM, Brazil

Carbon dioxide is the most important anthropogenic greenhouse gas (GHG) and the global atmospheric concentration of this compound has increased in the last centuries contributing to global climate change. In this sense, several research projects have suggest different forms to reduce atmospheric concentration of this compound and can be divided into three categories: i) to reduce power consumption, improving efficiency of use, ii) to reduce CO₂ emissions by using energy sources that do not release this gas, and iii) developing clean technologies capture and sequestration of CO₂, where the biological fixation of CO₂ by cultures of microalgae in photobioreactors, attracts great significance. Cultures of photosynthetic microalgae in photobioreactors is a sustainable strategy, since microalgae has a greater photosynthetic efficiency when compared to higher plants, can support high carbon dioxide concentrations and are able to produce essentials compounds using only inorganic materials (carbon dioxide and salts) and solar energy. The assimilation of carbon dioxide can promote the formation of volatile organic compounds (VOCs), extracellular biopolymers, precipitates carbonates and bicarbonates and incorporated, into the molecular structure of cells, proteins, carbohydrates and lipids. The biomass produced allows obtain products of high added value, such as, proteins, pigments, feed for animals, fatty acids, biodiesel, biogas, organic fertilizers and others. Also, microalgae may offer an alternative to conventional forms of secondary and tertiary wastewater treatment, due to their great efficiency in the removal of pollutants, as well as the possibility of the valorization of the residuals. Previous studies with the microalgae *Aphanothece microscopica Nægeli* cultures in bubbles columns photobioreactors, with synthetic medium BGN, demonstrate biomass production of 5,1g/L and maximum CO₂ sequestration rate of 18.7 ± 0.5 mg/L/min in 96 h of cultivation.

From oil refinery to microalgal biorefinery

Piovani, M. R.¹; Ribeiro, M. C. R.¹; Lacerda, L. M. C. F.¹; Vidotti, A. D.; Francisco, E. C.¹; Jacob-Lopes, E.^{1,2}; Franco, T. T.¹

1 - UNICAMP, Brazil. 2 - UFSM, Brazil

The objective of this work objective is to develop an integrated system for carbon dioxide biotransformation in oil refineries. Liquid and gaseous wastes from oil refining were considered for *Aphanothece microscopica Nageli* cultivation in a bubble column photobioreactor. Growth kinetics, carbon dioxide removal and oxygen release rates, carbon footprint and biodiesel production were studied. The obtained results showed the potential use of refinery wastes on microalgae-based systems. At optimized culture conditions a maximum specific growth rate of 1.4day^{-1} and a maximum carbon dioxide elimination capacity of 22.9mg/L.min were obtained. Each bioconverted CO_2 mass unit resulted in an approximately value of 0.75 released O_2 mass unit. Carbon footprint analyses indicated that a small carbon dioxide fraction was fixed on biomass form. Volatile organic compounds were the main routes of carbon dioxide biotransformation in the photobioreactor in such conditions. For biodiesel production, it was possible to obtain $0.08\text{g}_{\text{lipid}}/\text{L.day}$. Therefore, the developed microalgal is a promising emerging biorefinery platform to generate valuable chemical building blocks.



COBEQ2012

XIX CONGRESSO BRASILEIRO DE
ENGENHARIA QUÍMICA

09 a 12 de setembro de 2012
Búzios, RJ

XVIII Congresso Brasileiro de Engenharia Química COBEQ, Búzios, 2012

Modelagem de crescimento da microalga *Chlorella vulgaris*

L. M. C. F. LACERDA¹, A. D. S. VIDOTTI¹ e T. T. FRANCO¹

¹ Universidade Estadual de Campinas, Faculdade de Engenharia Química
E-mail para contato: franco.feq@gmail.com

RESUMO – Modelos matemáticos podem ser utilizados no controle e otimização de cultivos de microalgas representando uma ferramenta essencial no desenvolvimento desses processos. Nesse sentido, o objetivo deste trabalho foi avaliar o desempenho de diferentes modelos matemáticos aplicados ao crescimento celular da microalga *Chlorella vulgaris*. Os modelos testados foram Logístico (LO), Gompertz (GO), Gompertz modificado (GM) e Baranyi (BA). Métodos de análise de erro foram aplicados para validação dos resultados obtidos pelos modelos, sendo eles os métodos de Erro Médio Quadrático (RMSE), Erro Padrão de Predição (%SEP), Fator Bias (B_f), Fator de Precisão (A_f) e Coeficiente de Determinação (R^2). A definição do melhor desempenho foi obtida a partir dos resultados dos métodos de análise de erro e da análise das características de cada modelo (complexidade, facilidade na aplicação e uso, significado físico e interpretação dos parâmetros). Ao final do estudo, o melhor desempenho foi obtido utilizando o modelo de Gompertz Modificado. Os principais parâmetros cinéticos de crescimento celular ($X_{máx}$, $\mu_{máx}$, λ) da *Chlorella vulgaris* foram preditos e os valores dos métodos de análise de erros variaram entre 0,998 e 0,972 (R^2), 0,012 e 0,115 (RMSE); 0,001 a 0,005 (%SEP); 0,990 e 1,002 (B_f); 1,010 e 1,094 (A_f).

1. INTRODUÇÃO

Atualmente existe um crescimento mundial na produção de biomassa devido às suas diversas aplicações, dentre elas a produção de proteína unicelular, de carotenóides, clorofilas, enzimas, ésteres, vitaminas, lipídios (PULZ e GROSS, 2004; RICHMOND, 2004; BECKER, 2007; EL GAMAL, 2010), tratamento de águas residuais (MUNOZ e GUIEYSSE, 2006), biofertilizante para o solo, bioindicadores de nutrientes e/ou substâncias tóxicas e moléculas bioativas com propriedades medicinais (DERNER *et al.*, 2006).

Associado a este aumento está a crescente necessidade de desenvolvimento de tecnologias que permitam a produção de energia a partir de fontes renováveis que sejam tecnicamente viáveis, economicamente competitivas, ambientalmente aceitáveis e de fácil disponibilidade (DEMIRBAS, 2009).

Nesse sentido, inúmeros projetos de pesquisa têm sido desenvolvidos no sentido de aliar a produção de biodiesel e bio-produtos de origem microalgal. Em face disso, é importante aplicar a modelagem matemática para que se consiga conhecer algumas características importantes no cultivo e propagação desses microorganismos.

A modelagem matemática de crescimento microbiano tem sido utilizada para estimar parâmetros como velocidade específica de crescimento e duração da fase lag, que são necessários para o estudo do crescimento celular bem como na solução de diferentes tipos de problemas associados à otimização da produção de biomassa ou mesmo para uso preventivo na microbiologia de alimentos (BAQUERISSE *et al.*, 1999; LOPEZ *et al.*, 2004).

Esse tipo de modelagem é dividida em dois componentes, a parte determinística que representa a relação entre a variável resposta e a(s) variável(is) explanatória(s) e a parte estocástica que representa o quanto a resposta esperada se desvia da resposta observada ou real. A escolha de uma função para descrever uma determinada resposta é um exercício estatístico, haja vista que se está lidando com estimativas da resposta real. Em contraste, o ajuste da função escolhida aos dados é mais um exercício de álgebra, e consiste na determinação dos valores dos parâmetros que melhor ajustam o modelo escolhido ao conjunto de dados coletados (NETER *et al.*, 1996).

Esses modelos podem ser resolvidos usando algoritmos de ajuste de curvas, entre eles pode ser citado o Método de Gauss-Newton (NETER *et al.*, 1996), contudo, um especial cuidado deve ser tomado na escolha do ponto inicial, já que esse valor possui significativa influencia no ajuste da curva. Um ponto inicial muito distante do real pode fazer com que a solução divirja ou mesmo apresente um valor errado e incoerente fisicamente (MOTULSKY e RANSNAS, 1987). Também é importante ser capaz de quantificar objetivamente o ajuste do modelo, a fim de determinar a sua utilidade e poder compará-lo com outros modelos possíveis (YU *et al.*, 2008).

Alguns fatores devem ser levados em consideração para que modelos com funções diferentes possam ser comparados, entre eles: (i) ajuste da função aos dados e precisão dos valores observados em relação aos obtidos, (ii) complexidade do modelo, (iii) facilidade na aplicação e uso, (iv) significado físico dos parâmetros envolvidos no modelo e (v) interpretação dos parâmetros dos modelos (PHUA e DAVEY, 2007). A avaliação estatística do desempenho do modelo deve ser feita através de correlações matemáticas que comparem os valores observados e os valores obtidos pelos modelos.

Em face disto, o objetivo do presente trabalho foi avaliar estatisticamente e fenomenologicamente a possibilidade do uso de modelos matemáticos no estudo do crescimento da microalga *Chlorella vulgaris*.

2. MATERIAL E MÉTODOS

2.1. Microorganismo, Manutenção e Propagação do Inóculo

A microalga considerada foi a *Chlorella vulgaris* (CPCC90), originalmente obtida do Canadian Phycological Culture Centre. O meio de cultura utilizado foi o meio sintético BBM (STEIN, 1973).

A cultura estoque foi mantida e propagada em agar inclinado, nas condições de 20°C e 1klux de luminosidade. Todos os procedimentos foram realizados em câmara de fluxo laminar,

previamente esterilizada com álcool 70% e UV por 15 minutos. Todo o material e meio de cultivo utilizados foram esterilizados a 121°C por 20 minutos.

2.3. Preparo do Inóculo

Para cada Erlenmeyer de ágar inclinado fresco (de aproximadamente 7 dias) de *Chlorella vulgaris*, foram adicionados 3mL de meio BBM (STEIN, 1973), e com o auxílio de uma alça de inoculação descartável as células foram transferidas a outro frasco através de remoção mecânica. Após a homogeneização da massa celular em meio BBM, foram transferidos 3mL para cada Erlenmeyer contendo 50 mL de meio BBM com 10g.L⁻¹ de glicose e 1,2g.L⁻¹ de nitrato (razão C/N mantida em 20). Os frascos Erlenmeyers foram incubados em shaker (incubadora com agitação shaker e refrigeração - modelo 430 - RD - Nova Ética), a temperatura específica de crescimento de 26°C, na ausência de luminosidade, sob agitação constante de 140 rpm.

2.4. Experimentos

Os experimentos foram conduzidos em frascos erlenmeyers âmbar e aletados de 250mL. O volume de trabalho foi fixado em 50mL, considerando 0,3g.L⁻¹ de inóculo inicial. Os frascos foram incubados em shaker, na ausência de luminosidade, na temperatura de 26°C e agitação de 140rpm. Foram utilizadas diferentes concentrações iniciais de glicose 2, 10 e 20g.L⁻¹ (razão C/N=20 utilizando NaNO₃). Os testes foram realizados em duplicata e os dados cinéticos referem à média de 4 repetições.

A amostragem a cada tempo de residência celular foi realizada considerando o descarte do frasco para cada tempo avaliado. Considerou-se até 20 frascos em condições iniciais idênticas para o monitoramento do perfil de crescimento celular. A concentração celular foi monitorada diariamente por medida da densidade óptica a 680nm.

2.5. Modelos de Crescimento

Os modelos de crescimento celular podem ser obtidos por técnicas de regressão não linear. O modelo logístico descreve o crescimento celular de populações de microorganismos em função da concentração inicial e final, tempo e taxa de crescimento. A função original foi desenvolvida por (PEARL e REED, 1920), sendo baseada nos ensaios de VERHULST (1838) (Equação 1).

$$y = \frac{A + C}{1 + \exp^{(-B(t-M))}} \quad (1)$$

A equação original de gompertz não considera a fase lag, como é o caso de sua forma modificada, mas apenas o aumento da densidade de células, uma vez iniciado o crescimento exponencial (GOMPERTZ, 1895; MCMEEKIN *et al.*, 1993). Um grande número de funções tem sido derivadas do modelo clássico de gompertz que está apresentado na (Equação 2).

$$y = A + C \exp^{(-\exp[-B(t-M)])} \quad (2)$$

ZWIETERING *et al.* (1990) re-parametrizaram a equação de gompertz para incluir três parâmetros biológicos relevantes: tempo da fase lag, taxa de máximo crescimento específico e máxima concentração celular. Trata-se de uma função exponencial dupla, que descreve uma curva sigmóide assimétrica (WHITING e BUCHANAN, 1993). O modelo está representado na (Equação 3).

$$y = C \cdot \exp^{-\exp\left[\frac{\mu_{max} \exp(I)}{C}(\lambda - t) + I\right]} \quad (3)$$

O modelo proposto por BARANYI e ROBERTS (1994) incluiu uma fase de crescimento exponencial linear, $\mu(x)$ e uma fase lag determinada por uma função de ajuste $A(t)$ (Equações 4 e 5) (BARANYI *et al.*, 1993; BARANYI e ROBERTS, 1994; BARANYI *et al.*, 1997).

$$y = \mu_{max} A(t) - \ln\left(1 + \frac{\exp^{\mu_{max} A(t)} - 1}{\exp^c}\right) \quad (4)$$

$$A(t) = t + \frac{1}{\mu_{max}} \ln\left(\exp^{-\mu_{max} t} + \exp^{-\mu_{max} \lambda} - \exp^{-\mu_{max}(t+\lambda)}\right) \quad (5)$$

2.6. Resolução e Validação dos Modelos de Crescimento

A resolução dos modelos pode ser feita via método numérico (soma dos erros ou estimativa dos quadrados) (Rodríguez *et al.*, 2005). Neste estudo, foi utilizado o método de Newton para resolver as equações (1 a 5) no Microsoft Excel® XP. Estimativas iniciais dos valores dos parâmetros requeridos foram obtidas pelos valores encontrados fazendo-se o gráfico de $(\ln X)$ vs. (t) (LACERDA *et al.*, 2011). A minimização dos erros foi realizada através dos mínimos quadrados no Microsoft Excel® XP. Os índices de aderência do modelo aos resultados foram avaliados em função das seguintes expressões matemáticas e estatísticas (ROSS, 1996).

$$RMSE = \sqrt{\frac{\sum (obs - pred)^2}{n}} \quad (6)$$

$$\%SEP = \frac{100}{média\ obs} \sqrt{\frac{\sum (obs - pred)^2}{n}} \quad (7)$$

$$B_f = 10^{\frac{\sum \log(pred/obs)}{n}} \quad (8)$$

$$A_f = 10^{\frac{\sum |\log(pred/obs)|}{n}} \quad (9)$$

$$R^2 = \frac{\left(\sum (x_{pred} - \overline{x_{pred}})(x_{obs} - \overline{x_{obs}}) \right)^2}{\sum (x_{pred} - \overline{x_{pred}})^2 \sum (x_{obs} - \overline{x_{obs}})^2} \quad (10)$$

3. RESULTADOS E DISCUSSÕES

A modelagem matemática foi utilizada para prever o crescimento celular e estimar a máxima taxa de crescimento específico, máxima concentração celular e duração da fase lag que são parâmetros necessários ao estudo do crescimento microbiano e também muito usados na microbiologia industrial. A Tabela 1 apresenta os resultados dos índices de performance dos modelos. A Figura 1 representa o ajuste dos modelos aos dados experimentais.

O erro médio quadrático (RMSE) representa a adequação dos modelos aos dados experimentais. Quanto melhor o ajuste do modelo, mais próximo de zero será o valor do RMSE. Para os casos testados, os valores desse parâmetro variaram de 0,00 e 0,20.

O fator Bias (B_f) fornece uma indicação objetiva do desempenho do modelo, sendo que os melhores modelos apresentam valores sempre próximos a unidade (<1 revela que os valores preditos são menores que os observados e >1 revela que os valores preditos são maiores que os observados). ROSS (1996) apresentou que valores do fator de bias entre 0,9 e 1,05 são conseguidos através de bons modelos, valores entre 0,7-0,9 ou 1,06 e 1,15 através de modelos aceitáveis e valores $<0,7$ ou $>1,16$ são provenientes de modelos considerados inaceitáveis. Nas condições testadas, os valores do fator bias variaram entre 0,98 e 1,03.

O fator de exatidão (A_f) representa quanto os valores preditos diferem dos valores observados em média. Quanto mais próximo de 1, melhor será a adequação do modelo aos dados experimentais. Resultados superiores a 1 indicam que os valores preditos estão super-estimados e resultados inferiores a 1 indicam que os valores preditos estão sub-estimados (ROSS, 1996). Para as condições testadas foram obtidos valores entre 1,01 e 1,10.

O erro padrão de predição (%SEP) é a medida de precisão das predições, sendo que quanto mais próximo de zero, melhor a qualidade da predição. Os resultados obtidos para as condições testadas variaram de 1,08 a 8,27.

O coeficiente de determinação (R^2), por sua vez, é uma estimativa da qualidade da regressão linear entre os valores preditos e os observados. Os resultados variaram de 0,972 a 0,997.

A análise estatística dos dados associada aos 5 critérios básicos de escolha entre modelos mostrou que o modelo Gompertz Modificado é o que melhor descreve o crescimento do microorganismo, nas condições testadas. Por isso o modelo Gompertz Modificado pode ser considerado como estatisticamente suficiente e robusto para descrever o crescimento celular tanto

em termos de precisão estatística como em facilidade de uso, quando comparado a outras funções sigmoidais (MCDONALD e SUN, 1999). Neste sentido, o modelo Gompertz Modificado foi selecionado para prever o crescimento da *Chlorella vulgaris* cultivada em diferentes concentrações de glicose. Nas condições testadas o modelo Gompertz Modificado gerou os valores apresentados na Tabela 2, para os principais parâmetros de crescimento celular.

Tabela 1: Resultados dos índices de performance dos modelos

Glicose (g.L ⁻¹)	Erro	Modelos de Crescimento			
		LO	GO	GM	BA
2	Bias	1,00	1,00	1,00	1,00
	Exatidão	1,02	1,01	1,01	1,01
	%SEP	1,65	1,08	1,08	1,45
	RMSE	0,01	0,00	0,00	0,01
	R ²	0,994	0,997	0,997	0,996
10	Bias	1,03	0,99	0,99	0,98
	Exatidão	1,10	1,09	1,09	1,05
	%SEP	6,01	6,20	6,20	5,46
	RMSE	0,10	0,10	0,10	0,09
	R ²	0,985	0,984	0,984	0,988
20	Bias	1,03	0,99	0,99	0,98
	Exatidão	1,10	1,09	1,09	1,07
	%SEP	7,97	8,27	8,27	7,94
	RMSE	0,19	0,20	0,20	0,19
	R ²	0,974	0,972	0,985	0,975

Tabela 2: Resultados dos parâmetros preditos pelo modelo Gompertz Modificado

Glicose (g.L ⁻¹)	μ_{\max} (d ⁻¹)	X _{max} (g.L ⁻¹)	λ (d)
2	1,15	1,2*	0,00
10	1,75	2,5	0,00
20	1,32	3,7	0,05

*Este valor não foi atingido durante o período de experimental, visto que não foi atingida a fase estacionária

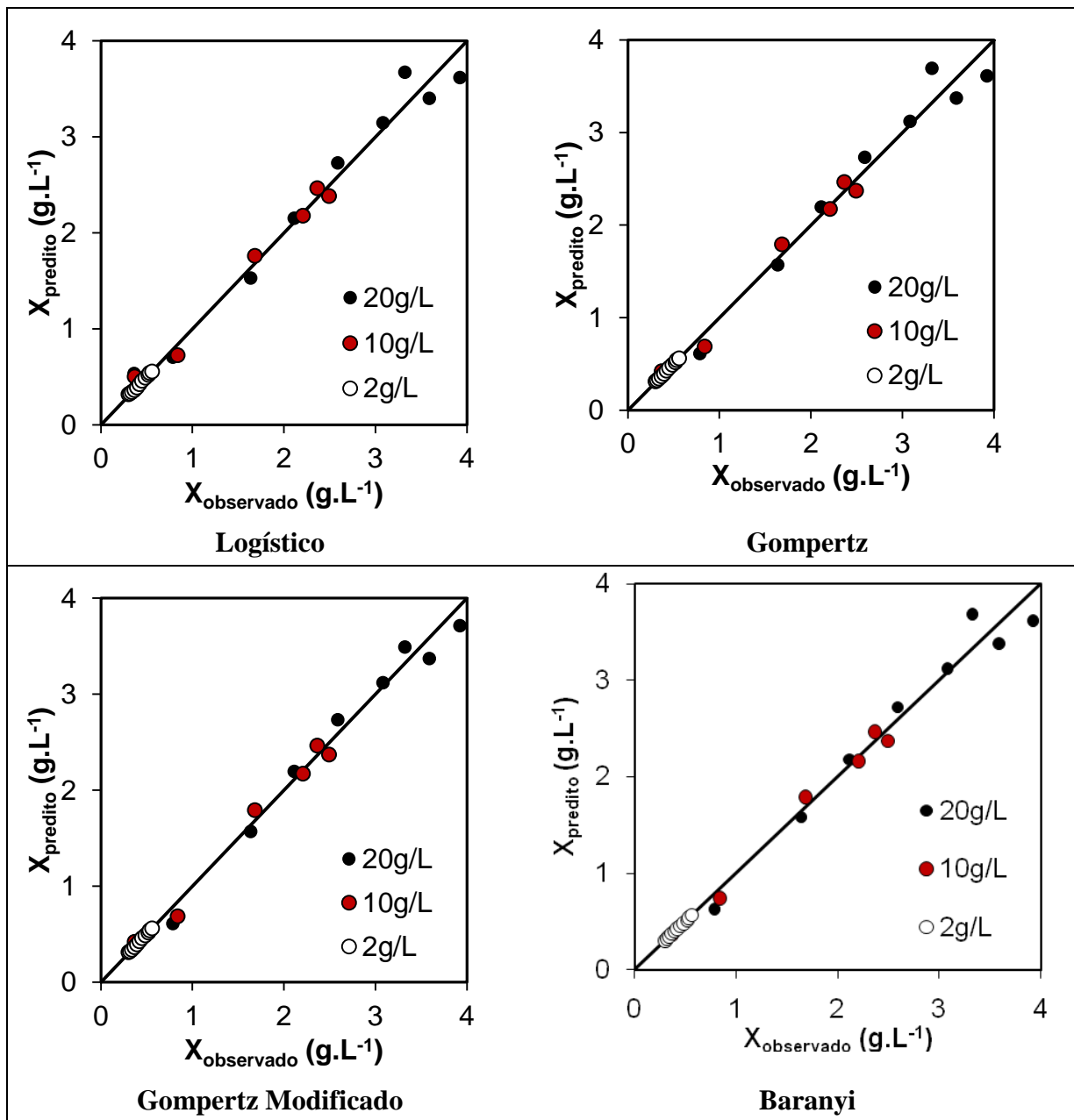


Figura 4: Ajuste dos modelos aos dados experimentais.

4. CONCLUSÕES

A microalga *Chlorella vulgaris* foi usada como base para os experimentos no sentido de maximizar a produção celular em cultivos contendo uma fonte de carbono orgânico. Para isso usou-se avaliar a aderência de vários modelos de crescimento celular aos dados obtidos experimentalmente. Através de análises estatísticas e verificação da significância física dos parâmetros, o modelo Gompertz Modificado foi escolhido por ser estatisticamente suficiente e

robusto para descrever o crescimento celular tanto em termos de precisão estatística como em facilidade de uso, quando comparado a outras funções sigmoidais.

5. NOMENCLATURA

Abreviaturas		
BA	Modelo Baranyi	
C/N	Razão Carbono/Nitrogênio	
GO	Modelo Gompertz	
GM	Modelo Gompertz Modificado	
LO	Modelo Logístico	
Média obs	Média dos valores observados	
Obs	Valores observados	
Pred	Valores preditos pelos modelos	
Síglas		
A	$\ln (X_{\max}/X_0)$	-
A(t)	Função de ajuste	H
B	Crescimento relativo no tempo t	h^{-1}
C	$\ln (X_0/X_0)$	
M	Tempo em que a taxa de crescimento é máxima	H
n	Número de amostragens analisadas	-
t	Tempo de Residência	H
X_0, X_{\max}, X	Concentração Celular Inicial, Máxima e no Tempo t	$mg.L^{-1}$
Y	$\ln (X_t/X_0)$	-
Símbolos Gregos		
λ	Duração da fase lag	h^{-1}
μ_{\max}	Velocidade máxima específica de crescimento	h^{-1}

6. AGRADECIMENTOS

Os autores agradecem o apoio financeiro dos órgãos FAPESP, CAPES e CNPQ.

7. REFERÊNCIAS

BAQUERISSE, D.; NOUALS, S.; ISAMBERT, A.; DOS SANTOS, P. F.; DURAND, G. Modelling of a continuous pilot photobioreactor for microalgae production. J. Biotech., v. 70, n. 1-3, p. 335-342, 1999.

BARANYI, J.; GIBSON, A. M.; PITT, J. I.; EYLES, M. J.; ROBERTS, T. A. Predictive models as means of measuring the relatedness of some *Aspergillus* species. Food Microbiol, v. 14, n. 4, p. 347-351, 1997.

BARANYI, J.; ROBERTS, T. A. A dynamic approach to predicting bacterial growth in food. Int J Food Microbiol, v. 23, n. 3-4, p. 277-94, Nov 1994.

BARANYI, J.; ROBERTS, T. A.; MCCLURE, P. A non-autonomous differential equation to model bacterial growth. Food Microbiol, v. 10, n. 1, p. 43-59, 1993.

BECKER, E. W. Micro-algae as a source of protein. *Biotechnol Adv*, v. 25, n. 2, p. 207-10, Mar-Apr 2007.

DEMIRBAS, A. Progress and recent trends in biodiesel fuels. *Energy Convers. Manage.*, v. 50, n. 1, p. 14-34, 2009.

DERNER, R. B.; OHSE, S.; VILELLA, M.; CARVALHO, S. M.; FETT, R. Microalgas, produtos e aplicações. *Ciência Rural*, v. 36, n. 6, p. 1959-1967, 2006.

EL GAMAL, A. A. Biological importance of marine algae. *Saudi Pharmaceutical J*, v. 18, n. 1, p. 1-25, 2010.

GOMPERTZ, B. On the nature of the function expressive of the law of human mortality, and on a new mode of determining the value of life contingences. *Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci*, v. 115, p. 513-585, 1895.

LACERDA, L. M. C. F.; QUEIROZ, M. I.; FURLAN, L. T.; LAURO, M. J.; MODENESI, K.; JACOB-LOPES, E.; FRANCO, T. T. Improving refinery wastewater for microalgal biomass production and CO₂ biofixation: Predictive modeling and simulation. *J Petrol Sci Eng*, v. 78, n. 3-4, p. 679-686, 2011.

LOPEZ, S.; PRIETO, M.; DIJKSTRA, J.; DHANOA, M. S.; FRANCE, J. Statistical evaluation of mathematical models for microbial growth. *Int J Food Microbiol*, v. 96, n. 3, p. 289-300, Nov 15 2004.

MCDONALD, K.; SUN, D. W. Predictive food microbiology for the meat industry: a review. *Int J Food Microbiol*, v. 52, n. 1-2, p. 1-27, Nov 1 1999.

MCMEELIN, T. A.; OLLEY, J.; ROSS, T. *Predictive Microbiology : Theory and Application*. John Wiley & Sons Ltd, 1993.

MOTULSKY, H. J.; RANSNAS, L. A. Fitting curves to data using nonlinear-regression – a practical and nonmathematical review. *Faseb J*, v. 1, p. 365-374, 1987.

MUNOZ, R.; GUIEYSSE, B. Algal-bacterial processes for the treatment of hazardous contaminants: a review. *Water Res*, v. 40, n. 15, p. 2799-815, Aug 2006.

NETER, J.; WASSERMAN, W.; KUTNER, M. H. *Applied linear statistical models*. 4^a Ed. Boston: McGraw-Hill, 1996.

PEARL, R.; REED, L. J. On the rate of growth of the population of the United States since 1790 and its mathematical representation. *Proc. Nat. Acad. Sci.*, v. 6, p. 275–288, 1920.

PHUA, S. T. G.; DAVEY, K. R. Predictive modeling of high pressure (<700MPa)–cold pasteurization (<25°C) of *Escherichia coli*, *Yersinia enterocolitica* and *Listeria monocytogenes* in three liquid foods. *Chem Eng Process*, v. 46, p. 458–464, 2007.

PULZ, O.; GROSS, W. Valuable products from biotechnology of microalgae. *Appl Microbiol Biotechnol*, v. 65, n. 6, p. 635-48, Nov 2004.

RICHMOND, A. Handbook of microalgal culture : biotechnology and applied phycology. Blackwell Science Ltd, 2004.

ROSS, T. Indices for performance evaluation of predictive models in food microbiology. *J Appl Bacteriol*, v. 81, n. 5, p. 501-8, Nov 1996.

STEIN, J. R. Handbook of phycological methods. Culture methods and growth measurements. London: Cambridge University Press, 1973. 1-448

VERHULST, P. Notice sur la population suit dans son accroissement. *Corresp. Math. Phys.*, v. 10, p. 113–121, 1838.

WHITING, R. C.; BUCHANAN, R. L. A classification of models for predictive microbiology. *Food Microbiol*, v. 10, p. 175-177, 1993.

YU, S.; CLARK, O. G.; LEONARD, J. J. A statistical method for the analysis of nonlinear temperature time series from compost. *Bioresour Technol*, v. 99, n. 6, p. 1886-95, Apr 2008.

ZWIETERING, M. H.; JONGENBURGER, I.; ROMBOUTS, F. M.; VAN 'T RIET, K. Modeling of the bacterial growth curve. *Appl Environ Microbiol*, v. 56, n. 6, p. 1875-81, Jun 1990.



35th Symposium on Biotechnology for Fuels and Chemicals, SBFC, Portland, 2013

Optimal coagulant doses to promote elevated biomass recovery efficiency

L.M.C.F. Lacerda ¹, T.T. Franco* ¹

¹ School of Chemical Engineering, State University of Campinas - UNICAMP, Brazil

franco@feq.unicamp.br (T.T. Franco*)

Because of the world energy crisis, global warming and restrict feedstock availability, alternative liquid fuels to petro fuel must be developed. Among the huge list of potential feedstocks for biofuel production, experts agree that a future overall approach would adopt an algal-based biorefinery model to convert biomass in biofuel (biodiesel, bioethanol, biogas and biohydrogen). However, a major challenge to scale up algal-based fuels is the improvement of the processes to harvest cells, which would increase the commercial potential of those. Harvesting microalgae can be difficult and costly, because of their small cell size and their low concentration. The choice of harvesting technique depends mainly on the characteristics of the microorganism and occurs in two stages process. In this research, flocculation followed by gravitational sedimentation was evaluated to promote the *Chlorella vulgaris* harvesting. Different concentrations of three organic coagulants and $\text{Al}_2(\text{SO}_4)_3$ were tested in a wide range of biomass concentrations and pHs to maximize the recovery efficiency (RE). The results showed that is possible to use pHs between 4-11 with the organic coagulant and between 7-8 with $\text{Al}_2(\text{SO}_4)_3$ obtaining more than 98% of RE with $0,08\text{g}_{\text{org_coag}}/\text{g}_{\text{biomass}}$ and $0,40\text{g}_{\text{Al}_2(\text{SO}_4)_3}/\text{g}_{\text{biomass}}$. Also, it was observed that organic flocculants are generally more effective, because can absorb several particles at once, forming a three-dimensional matrix that are easier to harvest. Finally, the use of low amounts of organic coagulant to promote biomass harvesting in a wide range of pH, with elevated RE is economically feasible.



***3rd International Conference on Algal
Biomass, Biofuels & Bioproducts, AlgalBBB,
Toronto, 2013***

Title:**Optimizing Microalgae Growth and CO₂ Mitigation****Authors & affiliations:***L.M.C.F. Lacerda I, T.T. Franco* I**¹ School of Chemical Engineering, State University of Campinas - UNICAMP, Brazil
franco@feq.unicamp.br (T.T. Franco*)***Abstract:**

The most environmentally sustainable ways to reduce CO₂ emissions is to generate energy from reduced-carbon-emission sources associated with energy production. Currently, microalgae biomass production are receiving great attention because can be associated with mitigation of CO₂ and production of clean energy (biodiesel, CH₄, H₂ and ethanol). In this sense, a factorial design (central composite rotatable design - CCRD) associated with response surface methodology (RSM) and a multi-criteria method (desirability function - D_f) were used to determine light intensity, nutrient availability (CO₂) and temperature that optimize simultaneously biomass growth and CO₂ mitigation. The optimized conditions to autotrophic *Chlorella vulgaris* cultivated in bubble columns photobioreactors were light intensity of 108 $\mu\text{mol.m}^{-2}.\text{s}^{-1}$, temperature of 26.5 °C and 8.05% of CO₂. The results obtained were: final/initial biomass concentration ratio (X_{max}/X_0) of 14.78; maximum specific growth rate (μ_{max}) of 1.02 d⁻¹; lag phase duration (λ) of 0.50 d; maximum productivity (P_{max}) of 0.58 g.L⁻¹.d⁻¹; mean productivity (P_{mean}) of 0.31 g.L⁻¹.d⁻¹; maximum carbon incorporation rate (CB_{max}) of 1.06 g.L⁻¹.d⁻¹ and mean carbon incorporation rate (CB_{mean}) of 0.55 g.L⁻¹.d⁻¹. These results show the potential use of *Chlorella vulgaris* to mitigate CO₂ and produce biomass that could be used to generate clean energy.

Title:***Substrate inhibition of *Chlorella vulgaris* by acetate in heterotrophic culture*****Authors & affiliations:**

A.D.S. Vidotti, L.M.C.F. Lacerda I, T.T. Franco I*

*¹ School of Chemical Engineering, State University of Campinas - UNICAMP, Brazil
franco@feq.unicamp.br (T.T. Franco*)*

Abstract:

Heterotrophic microalgal metabolic pathways show significant productivity gains in biomass when compared with the conventional photosynthetic systems. The cost of the carbon source is one of the most discussed drawbacks that can hinder the commercial application of that pathway. Thus, in order to improve its feasibility, low cost or even waste sources carbon-rich should be used. Sodium acetate is a substrate readily available and inexpensive, since it is derived from various industrial applications. Axenic cultures of *Chlorella vulgaris* were grown in culture media containing sodium acetate as exogenous carbon sources (2 to 20 g/L⁻¹) and its effect as inhibitor was investigated. Modeling of the biomass growth profiles (Logistic model) and substrate consumption (Haldane model) were also studied. Biomass production by *Chlorella vulgaris* was investigated in Erlenmeyer flasks. It was observed that 20 g.L⁻¹ of sodium acetate inhibited the growth of *Chlorella vulgaris* which was well represented by the used mathematical model. Our results indicated that the optimum concentration of sodium acetate to heterotrophic cultivation of *Chlorella vulgaris* was 3.5 ± 0.2 g.L⁻¹, which could be probably employed in continuous feeding system of a bioreactor. Finally, it was observed that the productivity of *Chlorella vulgaris* biomass was increased 70% with the fed batch operation and final biomass concentration (6.3 g.L⁻¹) 2.5 times greater than the cell concentration achieved in Erlenmeyer flasks (2.5 g.L⁻¹).



**XIX SIMPÓSIO NACIONAL DE BIOPROCESSOS
X SIMPÓSIO DE HIDRÓLISE ENZIMÁTICA DE BIOMASSAS**

30 de julho-02 de agosto de 2013
Foz de Iguaçu, PR, Brasil



XIX Simpósio nacional de Bioprocessos SINAFERM, Foz do Iguaçu, 2013

Cultivo autotrófico x heterotrófico - parte 1: crescimento celular e acúmulo de lipídios

A.D.S. VIDOTTI¹, L.M.C.F. LACERDA¹ e T.T. FRANCO¹

¹ Universidade Estadual de Campinas, Faculdade de Engenharia Química
E-mail para contato: franco.feq@gmail.com

RESUMO – Cultivos autotróficos de microalgas são os mais comuns, pois as mesmas são fotossintetizantes e muitas apresentam elevada eficiência na conversão da energia solar. Tecnicamente, o emprego da rota heterotrófica supera algumas limitações de engenharia relacionadas ao fornecimento de energia luminosa. Diante disso, uma comparação do desempenho dos cultivos autotrófico e heterotrófico utilizando a microalga *Chlorella vulgaris* foi realizada, baseada em dados cinéticos de crescimento celular e produtividade em biomassa. O cultivo heterotrófico apresentou maior crescimento celular comparado ao autotrófico, mas necessita de maiores tempos de cultivo: $X_{\text{máx}} = 2,26$ (7 d) e $1,60 \text{ g.L}^{-1}$ (4 d), respectivamente. Os valores de $\mu_{\text{máx}}$, $P_{x_máx}$ e % de lipídios foram melhores nos cultivos autotróficos, sendo eles: $1,02 \text{ d}^{-1}$, $0,4 \text{ g.L}^{-1}.\text{d}^{-1}$ e 50%, respectivamente. Esses resultados indicam que ambos os processos ainda precisam ser otimizados visando elevar a viabilidade de produção de biomassa microalgal em escala industrial.

1. INTRODUÇÃO

Sob a denominação de microalgas estão incluídos organismos procarióticos e eucarióticos (Mata *et al.*, 2010). Elas são capazes de obter energia a partir de diferentes metabolismos, sendo os principais o metabolismo autotrófico e o heterotrófico (Richmond, 2004).

As microalgas autotróficas são organismos que, na presença de luz, são capazes de converter CO_2 e água em biomassa, enquanto que as heterotróficas necessitam de uma fonte de carbono orgânico para produzir os compostos necessários para manutenção da vida (Brennan e Owende, 2010).

Os cultivos apresentam vantagens ambientais, pois o cultivo autotrófico atua na mitigação de dióxido de carbono, reduzindo as emissões atmosféricas deste composto, já o cultivo heterotrófico permite a utilização de resíduos industriais como fonte de carbono orgânico. Em ambos os casos a biomassa produzida, após tratamento adequado, pode ser utilizada na geração de energia (biodiesel, etanol, metano e hidrogênio).

Os sistemas de cultivo mais comuns em autotrofia incluem reatores abertos (raceway, reatores circulares e reatores retangulares) e fotobiorreatores (coluna de bolhas, placas paralelas e airlift), ambos baseados na disponibilidade de luz para promover o crescimento fotossintético. Estes reatores possuem alguns inconvenientes se construídos em grande escala, dentre eles: dispersão de luz ineficiente em grandes volumes e elevadas concentrações celulares (Perez-Garcia *et al.*, 2010).

O cultivo heterotrófico em biorreatores convencionais não apresenta problemas relacionados a disponibilidade de luz, mas em relação ao custo da fonte de carbono orgânico e o gasto energético para manutenção da axenia.

Diante disso, uma comparação do desempenho dos cultivos autotrófico e heterotrófico utilizando a microalga *C. vulgaris* foi realizada, baseada nos dados cinéticos de crescimento celular e produtividade em biomassa.

2. MATERIAL E MÉTODOS

C. vulgaris (CPCC90) foi cultivada em meio sintético BBM (Stein, 1973). Os cultivos autotróficos foram conduzidos em reatores do tipo coluna de bolhas de 3 L de volume de trabalho, considerando 0,1 g.L⁻¹ de inóculo inicial, 26 °C, 108 μmol.m⁻².s⁻¹ de luminosidade (24 h por dia), agitação de 1 VVM de ar contendo 8,05% de CO₂. Os cultivos heterotróficos foram conduzidos em frascos Erlenmeyers âmbar e aletados de 50 mL de volume de trabalho, considerando 0,3 g.L⁻¹ de inóculo inicial, 26 °C, ausência de luminosidade, agitação de 140 rpm e 8 g.L⁻¹ de acetato de sódio mantendo uma relação C/N de 20. Ambos os cultivos foram realizados em triplicata e finalizados no início da fase estacionária de crescimento celular e a biomassa foi liofilizada.

A concentração celular foi determinada indiretamente por medida da densidade ótica, com leitura em 660 nm em Espectrofotômetro digital. A axenia dos cultivos foi verificada por microscopia ótica, em um Microscópio Biológico com vídeo acromático BVM-100 (Marca Bel Photonics, Milano, Itália). Foi utilizado o método de extração Bligh e Dyer (Bligh e Dyer, 1959) com prévia digestão ácida e quantificação gravimétrica para a determinação do teor de lipídeos presente na biomassa liofilizada.

A velocidade máxima específica de crescimento ($\mu_{\text{máx}}$) foi calculada pelo coeficiente angular da equação da reta $\ln(X)$ x t . O conteúdo lipídico da microalga (%Lipídios) (Converti *et al.*, 2009) e a produtividade celular máxima ($P_{X_{\text{máx}}}$) foram calculados pelas equações abaixo.

$$\% \text{Lipídios} = W_L / W_X \quad (1)$$

$$P_{X_{\text{máx}}} = \frac{X_{\text{máx}} - X_0}{t_{X_{\text{máx}}} - t_0} \quad (2)$$

3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

A influência do tipo de cultivo na produção de biomassa microalgal foi avaliada baseada em dados cinéticos de crescimento celular e produtividade de biomassa. Os resultados estão apresentados na Figura 1 e Tabela 1. O cultivo heterotrófico apresentou maior crescimento celular comparado ao autotrófico: $X_{\text{máx}} = 2,26$ e $1,60$ g.L⁻¹, respectivamente. O tempo necessário para obtenção dessas concentrações celulares foi: $t_{X_{\text{máx}}} = 7$ e 4 dias, respectivamente.

Os valores de $\mu_{\text{máx}}$, $P_{X_{\text{máx}}}$ e % de lipídios foram melhores nos cultivos autotróficos, sendo eles: $1,02$ d⁻¹, $0,4$ g.L⁻¹.d⁻¹ e 50% , respectivamente. Segundo a literatura, cultivos da *C. vulgaris* com 10% de CO₂ e 25 °C atingiram máximas produtividades $0,105$ g.L⁻¹.d⁻¹ e cultivos

com ar e 25 °C alcançam 0,04 g.L⁻¹.d⁻¹ (Brennan e Owende, 2010), valores esses inferiores aos obtidos neste trabalho.

Nos cultivos heterotróficos foram obtidos 0,29 d⁻¹, 0,276 g.L⁻¹.d⁻¹ e 25%, respectivamente para $\mu_{\text{máx}}$, $P_{x_{\text{máx}}}$ e % de lipídios. Liang *et al.* (2009) trabalhando com mesma microalga em condições semelhantes de cultivo obteve produtividade máxima de 0,087 g.L⁻¹.d⁻¹, e máxima concentração celular de 0,99 g.L⁻¹ em 12 dias de cultivo, valores inferiores aos obtidos no presente trabalho.

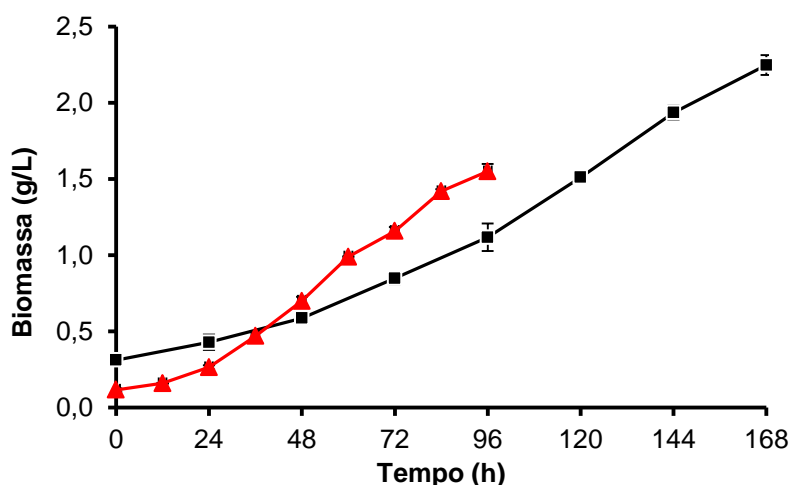


Figura 1: Perfis de crescimento celular no cultivo heterotrófico (-■-) e no cultivo autotrófico (-▲-).

Tabela.1-Parâmetros cinéticos de crescimento celular dos cultivos heterotrófico e autotrófico

Parâmetro	Heterotrófico	Autotrófico
$X_{\text{máx}}$ (g.L ⁻¹)	2,26 ± 0,09	1,60 ± 0,02
$\mu_{\text{máx}}$ (d ⁻¹)	0,29 ± 0,00	1,02 ± 0,01
$t_{x_{\text{max}}}$ (d)	8 ± 0	4 ± 0
$P_{x_{\text{máx}}}$ (g.L ⁻¹ .d ⁻¹)	0,276 ± 0,007	0,40 ± 0,02
% Lipídio	25 ± 0	50 ± 0

No cultivo heterotrófico verificou-se que o acetato de sódio foi consumido em 168 horas de cultivo, já o nitrogênio não foi consumido totalmente o que indica que este substrato foi adicionado em excesso, favorecendo o crescimento celular (Fontenot *et al.*, 2006). No cultivo autotrófico o nitrogênio foi o substrato limitante visando o aumento de acúmulo de lipídios (dados não demonstrados).

4. CONCLUSÕES

Uma comparação do desempenho dos cultivos autotrófico e heterotrófico utilizando a microalga *Chlorella vulgaris* foi realizada. O cultivo heterotrófico apresentou maior crescimento

celular comparado ao autotrófico, mas necessita de maiores tempos de cultivo: $X_{\text{máx}} = 2,26$ (7 d) e $1,60 \text{ g.L}^{-1}$ (4 d), respectivamente. Já os valores de $\mu_{\text{máx}}$, $P_{x_{\text{máx}}}$ e % de lipídios foram melhores nos cultivos autotróficos ($1,02 \text{ d}^{-1}$, $0,4 \text{ g.L}^{-1}.\text{d}^{-1}$ e 50%, respectivamente). Esses resultados indicam que ambos os processos ainda precisam ser otimizados visando elevar a viabilidade de produção de biomassa microalgal em escala industrial.

5. NOMENCLATURA

$X_{\text{máx}}$	Concentração celular máxima	g.L^{-1}	X_0	Concentração celular inicial	g.L^{-1}
$\mu_{\text{máx}}$	Máxima velocidade específica de crescimento celular	d^{-1}	W_L, W_X	Massa de lipídio e massa celular	g
t_0	Tempo inicial	d	$P_{x_{\text{máx}}}$	Produtividade celular máxima	$\text{g.L}^{-1}.\text{d}^{-1}$
$t_{x_{\text{máx}}}$	Tempo para alcançar $X_{\text{máx}}$	d	Lipídio	% lipídios na biomassa seca	%

6. REFERENCIAS

- BLIGH, E. G.; DYER, W. J. A rapid method of total lipid extraction and purification. *Can. J. Physiol.*, v. 37, p. 911 – 917, 1959.
- BRENNAN, L.; OWENDE, P. Biofuels from microalgae--A review of technologies for production, processing, and extractions of biofuels and co-products. *Renew. Sust. Energ. Rev.*, v. 14, p. 557-577, 2010.
- CONVERTI, A.; CASAZZA, A. A.; ORTIZ, E. Y.; PEREGO, P.; DEL BORGHI, M. Effect of temperature and nitrogen concentration on the growth and lipid content of *Nannochloropsis oculata* and *Chlorella vulgaris* for biodiesel production. *Chem. Eng. Process.: Process Intensification*, v. 48, p. 1146-1151, 2009.
- FONTENOT, Q.; BONVILLAIN, C.; KILGEN, M.; BOOPATHY, R. Effects of temperature, salinity, and carbon:nitrogen ratio on sequencing batch reactor treating shrimp aquaculture wastewater. *Bioresource Technol.*, 2006.
- LIANG, Y. N.; SARKANY, N.; CUI, Y. Biomass and lipid productivities of *Chlorella vulgaris* under autotrophic, heterotrophic and mixotrophic growth conditions. *Biotechnol Lett*, v.31, p.1043-1049, 2009.
- MATA, T. M.; MARTINS, A. A.; CAETANO, N. S. Microalgae for biodiesel production and other applications: A review. *Renew. Sust. Energ. Rev.*, v. 14, p. 217-232, 2010.
- PEREZ-GARCIA, O.; ESCALANTE, F.M.E.; DE-BASHAN, L.E.; BASAHN, Y. Heterotrophic cultures of microalgae: Metabolism and potential products. *Water Res.*, v. 45, p. 11-36, 2010.
- RICHMOND, A. Handbook of Microalgal Culture: Biotechnology and Applied Phycology. Blackwell Sciences Ltd, 2004.
- STEIN, J. R. Handbook of phycological methods. Culture methods and growth measurements, Cambridge University Press, London, 1973.

Cultivo autotrófico x heterotrófico – parte 2: Predição da qualidade do biodiesel

L.M.C.F. LACERDA¹, A.D.S. VIDOTTI¹, M. R. PIOVANI¹ e T.T. FRANCO¹

¹ Universidade Estadual de Campinas, Faculdade de Engenharia Química
E-mail para contato: franco.feq@gmail.com

RESUMO – A adequação do biodiesel de microalgas é influenciada pelo perfil de ácidos graxos. Nesse sentido, foi avaliada a influência do tipo de cultivo no perfil de ácidos graxos e, conseqüentemente, na qualidade do biodiesel. Correlações estabelecidas na literatura foram utilizadas na predição dos parâmetros de qualidade e os resultados foram comparados com as normas ASTM-D6751, EN14214/14213, e ANP 255/2003. Melhores valores foram obtidos em cultivo autotrófico da *Chlorella vulgaris*, sendo eles: CN=53, ρ =863 kg/m³, II=97 g_{l2}/100g, Δ H_C=39,2 kJ/g, OSI=13,8 h e ν =3,93 mm².s. A vantagem do cultivo heterotrófico está relacionada à %C18:3=7,24, que está abaixo do limite de 12% (EN14214). Esses resultados evidenciam a qualidade das características do óleo de *C. vulgaris* como matéria prima para produção de biodiesel, contudo o processo deve ser otimizado para viabilizar a produção em escala industrial.

1. INTRODUÇÃO

As normas de biodiesel ASTM-D6751 (EUA), EN-14214/14213 (Europa), ANP-255/2003 (Brasil) estabelecem limites para CN, ρ , ν , Δ H_C, OSI, II, % C18:3 para assegurar elevada qualidade, confiabilidade e segurança à saúde pública. A qualidade do biodiesel é diretamente influenciada pelas características individuais dos ácidos graxos que originaram os FAMES (Knothe, 2005, Ramos *et al.*, 2009), sendo que diversos fatores influenciam a produção de lipídios e o perfil de ácidos graxos por microalgas: intensidade luminosa, temperatura e nutrientes adicionados (Radmann e Costa, 2008).

Determinar experimentalmente a qualidade do biodiesel requer maiores quantidades de amostra e pode ser dispendioso e demorado. Nesse sentido, estudos da influencia do perfil de ácidos graxos na qualidade do biodiesel ajudam a reduzir custo e tempo de análise e estão sendo conduzidos por muitos grupos (Gopinath *et al.*, 2009, Knothe, 2005, Pereyra-Irujo *et al.*, 2009, Pratas *et al.*, 2011, Ramos *et al.*, 2009). Nesse trabalho, modelos para predição de 4 propriedades do biodiesel em função do perfil de ácidos graxos foram apresentados. O impacto do tipo de cultivo no perfil de ácidos graxos também foi analisado. A qualidade e a aplicabilidade da *C. vulgaris* como matéria prima para a produção de biodiesel foram verificadas a partir de comparações com as normas ASTM, ANP e EN.

2. MATERIAL E MÉTODOS

A microalga *C. vulgaris* (CPCC90) foi cultivada em meio sintético BBM (Stein, 1973). Os cultivos autotróficos foram conduzidos em reatores do tipo coluna de bolhas de 3 L de volume de

trabalho, considerando 0,1g.L⁻¹ de inóculo inicial, 26 °C, 108 µmol.m⁻².s⁻¹ de luminosidade (24 h por dia), agitação de 1 VVM de ar contendo 8,05% de CO₂. Os cultivos heterotróficos foram conduzidos em frascos Erlenmeyers âmbar e aletados de 50mL de volume de trabalho, considerando 0,3g.L⁻¹ de inóculo inicial, 26 °C, ausência de luminosidade, agitação de 140 rpm e 8 g.L⁻¹ de acetato de sódio mantendo uma relação C/N de 20. Os cultivos foram realizados em triplicata e finalizados no início da fase estacionária de crescimento celular. A biomassa do final dos experimentos foi liofilizada e diretamente transesterificada, sem a etapa de extração (Lewis *et al.*, 2000).

O perfil dos FAMES foi analisado em um sistema de cromatografia gasosa GC-2014 (Shimatzu) com detector por inozação de chama (FID) e a identificação dos FAMES foi confirmada em cromatógrafo gasoso com detector de massas GC/MS-2010 (Shimatzu) ambos utilizando coluna capilar Stabilwax, 30 m, 0,25 mm I.D., 0,25 µm. Para a eletroinoização foi utilizado 70 eV. Em ambos os casos, hélio foi a fase móvel utilizada com pressão de 15 psi, split 1/100, 250 °C no injetor e 300 °C no detector. A rampa de temperatura para a coluna foi: 50 °C por 2min, gradiente de 10 °C/min até atingir 180 °C, 5 minutos em espera à 180 °C, gradiente de 5 °C/min até atingir 240 °C, totalizando 32 minutos de corrida cromatográfica. O volume injetado para cada análise foi de 1 µL. A partir do perfil dos FAMES foram estimados 6 parâmetros que regulamentam a qualidade do biodiesel, como detalhado na Tabela 1.

Tabela 1: Parâmetros para análise de qualidade do Biodiesel.

Parâmetro	Eq.	Parâmetro	Eq.
$NC = 46.3 + \frac{5458}{\sum \frac{560. \%ME}{MM_{ME}}} - 0.225II$	(11)	$\Delta H_c = \sum \frac{\Delta H_{c,ME} \%ME}{100}$	(12)
$II = \sum \frac{254. N_{L= \%ME}}{MM_{ME}}$	(13)	$OSI = \sum \frac{OSI_{ME} \%ME}{100}$	(14)
$\rho = \sum \frac{\rho_{ME} \%ME}{100}$	(15)	$\ln(v) = \sum \frac{\ln(v_{ME}) \%ME}{100}$	(16)

Fonte: (Gopinath *et al.*, 2009, Pereyra-Irujo *et al.*, 2009, Pratas *et al.*, 2011).

3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

Os parâmetros cinéticos de crescimento estão apresentados na Tabela 2. As amostras obtidas no início da fase estacionária de crescimento foram transesterificadas via catalise ácida, para evitar reações de saponificação, devido à acidez do óleo de microalgas. Não foram realizados testes para verificar a presença de contaminantes, após o processo de transesterificação. O perfil de ácidos graxos está apresentado na Tabela 3. Os FAMES acumulados foram C16:0, C16:1, C16:2, C16:3, C18:0, C18:1, C18:2, e C18:3 e outros em menor quantidade. Esses mesmos compostos foram encontrados na *C. vulgaris* por Petkov e Garcia (2007). Os FAMES comumente encontrados no biodiesel são C16:0, C18:0, C18:1, C18:2 e C18:3 (Knothe, 2005) e correspondem a ≅ 91 e 87% dos FAMES encontrados nas amostras autotróficas e heterotróficas, respectivamente.

As Tabelas 4 e 5 contêm, respectivamente, as propriedades dos FAMES coletadas da literatura e os resultados da predição dos parâmetros de qualidade comparados com as normas americana, européia e brasileira. Os valores preditos de CN, ρ , ν , ΔH_C , OSI, II se adequam aos limites impostos pelas 3 normas em ambos os casos, com exceção ao CN do cultivo heterotrófico (48) que está abaixo do limite da norma européia (51). Contudo, a vantagem do biodiesel do cultivo heterotrófico está na baixa porcentagem de C18:3 (7,24), que é inferior ao estabelecido pela norma EN 14214 (12%). Apesar das características do óleo da *C. vulgaris* o tornarem um potencial candidato para a produção de biodiesel, melhorias nos processos de produção e separação da biomassa, bem como na produção de biodiesel devem ser desenvolvidas para viabilizar economicamente a produção em larga escala.

Tabela 2: Parâmetros cinéticos de crescimento da *C. vulgaris* em ambos os cultivos.

Parâmetro	$X_{\text{máx}} (\text{g.L}^{-1})$	$\mu_{\text{máx}} (\text{d}^{-1})$	$t_{x \text{ max}} (\text{d})$	$P_{x \text{ máx}} (\text{g.L}^{-1}.\text{d}^{-1})$	% Lipídio
Heterotrófico	2,26 \pm 0,09	0,29 \pm 0,00	8 \pm 0	0,28 \pm 0,01	25
Autotrófico	1,60 \pm 0,02	1,02 \pm 0,01	4 \pm 0	0,40 \pm 0,02	50

Tabela 3: Perfil de FAMES da *C. vulgaris*.

Cultivo	FAMES (%)												
	C5:0	C16:0	C16:1	C16:2	C16:3	C18:0	C18:1	C18:2	C18:3	Others	SFA	MUFA	PUFA
Auto	0,51	25,18	0,81	1,36	5,32	5,99	40,89	6,12	12,72	1,11	31,68	41,70	25,52
Hetero	2,11	19,28	1,38	8,11	0,94	3,50	27,07	29,88	7,24	0,49	24,89	28,45	46,17

Tabela 4: Propriedades dos FAMES coletadas da literatura.

FAME	5:0	C16:0	C16:1	C16:2	C16:3	C18:0	C18:1	C18:2	C18:3
Formula	$\text{C}_6\text{H}_{10}\text{O}_3$	$\text{C}_{17}\text{H}_{34}\text{O}_2$	$\text{C}_{17}\text{H}_{32}\text{O}_2$	$\text{C}_{17}\text{H}_{30}\text{O}_2$	$\text{C}_{17}\text{H}_{28}\text{O}_2$	$\text{C}_{19}\text{H}_{38}\text{O}_2$	$\text{C}_{19}\text{H}_{36}\text{O}_2$	$\text{C}_{19}\text{H}_{34}\text{O}_2$	$\text{C}_{19}\text{H}_{32}\text{O}_2$
MW (g/mol)	130,14	270,46	268,44	266,42	264,10	298,51	296,49	294,48	292,46
ρ (kg/m³)	875 ^b	852 ^b	875 ^b	900 ^b	911 ^b	850 ^b	874 ^b	889 ^b	895 ^b
ν (mm².s)	0,53 ^f	4,32 ^a	3,67 ^c	3,08 ^d	2,59 ^d	4,74 ^a	4,51 ^a	3,27 ^a	3,14 ^a
ΔH_C (kJ/g)	28,08 ^f	39,47 ^a	39,32 ^a	39,14 ^d	38,86 ^d	40,10 ^a	39,93 ^a	39,72 ^a	39,37 ^a
OSI (h)	>40 ^e	>40 ^c	2,1 ^c	0,49 ^d	0,15 ^d	>40 ^c	2,50 ^c	1,00 ^c	0,20 ^c
CN	17,8 ^f	74,5 ^a	51 ^a	33,1 ^d	20,7 ^d	101 ^a	59,3 ^a	42,2 ^a	22,7 ^a

Fonte: ^a (Knothe, 2005); ^B (Lapuerta *et al.*, 2010); ^c (Moser, 2009); ^d proporção geométrica entre os valores de C18:0 a C18:3 aplicados a C16:0 to C16:3, ^e (Moser, 2009), ^f C5:0 propriedades estimadas a partir de C4:0.

Tabela 5: Comparação dos resultados com os limites estabelecidos pelas normas.

	ρ (kgm ⁻³)	ν (mm ² .s)	ΔH_C (kJ.g ⁻¹)	OSI (h)	CN	II (g _{I2} /100g)	%C18:3
Autotrófico	863	3,93	39,2	13,8	53	97	12,72
Heterotrófico	873	3,62	39,1	7,4	48	113	7,24
ASTM D6751	-	1,9-6,0	-	-	Min 47	-	-
EN 14214/13	860-900	3,5-5,0	35	Min 6 e 4	Min 51	Max 120/130	12
ANP 255/2003	-	-	-	-	Min 45	-	-

4. CONCLUSÕES

A influência do tipo de cultivo no perfil de ácidos graxos e, conseqüentemente, na qualidade do biodiesel foi avaliada. Correlações estabelecidas na literatura foram utilizadas na

predição dos parâmetros de qualidade e os resultados foram comparados com as normas ASTM-D6751, EN14214/14213, e ANP 255/2003. Melhores resultados de ρ , ν , ΔH_C , OSI, II foram obtidos no cultivo autotrófico, mas a vantagem do cultivo heterotrófico está relacionada à %C18:3=7,24, que está abaixo do limite de 12% (EN14214). Esses resultados evidenciam a qualidade das características do óleo de *C. vulgaris* como matéria prima para produção de biodiesel, contudo o processo deve ser otimizado para promover a viabilidade da produção em escala industrial.

5. NOMENCLATURA

CN	Número de Cetano	-	II	índice de iodo	g _{I2} /100g
ΔH_C	Calor de combustão	kJ/g	ΔH_{C_ME}	Calor de combustão do éster	kJ/g
MM_{ME}	Massa molecular do éster	g/mol	%ME	Porcentagem do éster metílico	-
OSI	Índice de estab. à oxidação	H	OSI_{ME}	Índice de estab. a oxidação do éster	H
$\rho; \rho_{ME}$	Densidade e dens. do ester	kg/m ³	$\nu; \nu_{ME}$	Viscosidade e visc. do éster	mm ² .s

6. REFERENCIAS

- GOPINATH, A.; PUHAN, S.; NAGARAJAN, G. Relating the cetane number of biodiesel fuels to their fatty acid composition: A critical study. *Proceedings of the Institution of Mechanical Engineers, Part D: J. Automobile Eng.*, v. 223, p. 565-583, 2009.
- KNOTHE, G.; GERPEN, J.V.; KRAHL, J. The biodiesel Handbook, AOCS Press, 2005.
- LAPUERTA, M.; RODRÍGUEZ-FERNÁNDEZ, J. e ARMAS, O. Correlation for the estimation of the density of fatty acid esters fuels and its implications. A proposed Biodiesel Cetane Index. *Chem. Phys. Lipids*, v. 163, p. 720-727, 2010.
- LEWIS, T.; NICHOLS, P.D.; MCMEEKIN, T. A. Evaluation of extraction methods for recovery of fatty acids from lipid-producing microheterotrophs. *J. Microbiol. Meth.*, v. 43, p. 107-116, 2000.
- MOSER, B. Biodiesel production, properties, and feedstocks. *In Vitro Cell. Dev-Pl*, v. 45, p. 229-266, 2009.
- MOSER, B. Comparative Oxidative Stability of Fatty Acid Alkyl Esters by Accelerated Methods. *J. Am. Oil Chem. Soc.*, v. 86, p. 699-706, 2009.
- PEREYRA-IRUJO, G. A.; IZQUIERDO, N. G.; COVI, M.; NOLASCO, S. M.; QUIROZ, F. e AGUIRREZÁBAL, L. A. N. Variability in sunflower oil quality for biodiesel production: A simulation study. *Biomass Bioenerg.*, v. 33, p. 459-468, 2009.
- PETKOV, G.; GARCIA, G. Which are fatty acids of the green alga *Chlorella*? *Biochem. Syst. Ecol*, v. 35, p. 281-285, 2007.
- PRATAS, M. J.; S.V.D., F.; OLIVEIRA, M. B.; MONTEIRO, S. C.; LIMA, A. S. e COUTINHO, J. A. P. Biodiesel Density: Experimental Measurements and Prediction Models. *Energy Fuels*, v. 25, p. 2333-2340, 2011.
- RADMANN, E. M.; COSTA, J. A. V. Conteúdo lipídico e composição de ácidos graxos de microalgas expostas aos gases CO₂, SO₂ e NO. *Química Nova*, v. 31, p. 1609-1612, 2008.
- RAMOS, M. J.; FERNÁNDEZ, C. M.; CASAS, A.; RODRÍGUEZ, L. e PÉREZ, Á. Influence of fatty acid composition of raw materials on biodiesel properties. *Bioresource Technol.*, v. 100, p. 261-268, 2009.
- STEIN, J. R. Handbook of phycological methods. Culture methods and growth measurements, Cambridge University Press, London, 1973.

Produção de biodiesel a partir de microalgas e leveduras

L.M.C.F. LACERDA¹, E. M. REIS¹, A. ANSCHAU¹, M. R. PIOVANI¹ e T.T. FRANCO¹

¹ Universidade Estadual de Campinas, Faculdade de Engenharia Química
E-mail para contato: franco.feq@gmail.com

RESUMO – A procura por combustíveis alternativos aos fósseis tem sido intensa nas últimas décadas, sendo microalgas e leveduras oleaginosas matérias primas com grande potencial para produção de biodiesel. *Chlorella vulgaris* e *Lipomyces starkeyi* foram avaliadas em relação ao perfil de ácidos graxos acumulados e a qualidade estimada do biodiesel a ser obtido. Correlações estabelecidas pela literatura foram utilizadas na predição dos parâmetros de qualidade e os resultados comparados com as normas ASTM-D6751, EN14214/14213, e ANP 255/2003. Em ambos os cultivos, o perfil de ácidos graxos apresentou os compostos comumente encontrados no biodiesel e os resultados da predição de qualidade se enquadraram nas três normas avaliadas. Esses resultados indicam o potencial do óleo de *C. vulgaris* e da *L. starkeyi* como matérias primas para produção de biodiesel.

1. INTRODUÇÃO

Por causa da crise energética mundial e da preocupação com o aquecimento global, combustíveis alternativos aos combustíveis de petróleo precisam ser tecnicamente viáveis, economicamente competitivos, ambientalmente aceitáveis e facilmente disponíveis. Dentre a enorme lista de matérias-primas com potencial para a produção de biodiesel estão as microalgas e as leveduras oleaginosas (Meng *et al.*, 2009).

Microalgas são capazes de converter CO₂ e água em biomassa contendo lipídios, carboidratos e proteínas, que após adequado tratamento pode gerar vários tipos de biocombustíveis (biodiesel, metano, etanol e hidrogênio) (Yen *et al.*, 2012). Leveduras oleaginosas são fungos unicelulares ricos em lipídios cultivados a partir de diferentes fontes de carbono orgânico (Ageitos *et al.*, 2011).

A qualidade do biodiesel é diretamente influenciada por contaminantes remanescentes do processo de produção bem como pelas características individuais dos ácidos graxos que originaram os FAMES (Knothe, 2005, Ramos *et al.*, 2009). Nesse sentido, diferentes normas estabelecem limites para CN, ρ , ν , Δ HC, OSI, II, % C18:3, dentre outras características, para assegurar elevada qualidade, confiabilidade e segurança à saúde pública.

Nesse trabalho, diferenças no perfil de ácidos graxos dos micro-organismos foram avaliadas e modelos para predição de 6 propriedades do biodiesel (CN, ρ , ν , Δ HC, OSI, II, % C18:3), em função do perfil de ácidos graxos, foram apresentados. A qualidade e a aplicabilidade da *C. vulgaris* e *L. starkeyi*, como matéria prima para a produção de biodiesel, foram avaliadas em função das normas ASTM-D6751, EN14214/13 e ANP 255/2003.

2. MATERIAL E MÉTODOS

A *C. vulgaris* (CPCC90) foi cultivada em reator do tipo coluna de bolhas de 3 L de volume de trabalho, considerando 0,1 g.L⁻¹ de inoculo inicial, 26 °C, 108 µmol.m⁻².s⁻¹ de luminosidade (24 h por dia), agitação de 1 VVM de ar contendo 8,05 % de CO₂. A *L. starkeyi* (DSM 70296) foi cultivada em fermentador (BioFlo/CelliGen 115, New Brunswick Scientific, USA) de 3 L, considerando 3,0 g.L⁻¹ de inoculo inicial, 28 °C, aeração de 1 VVM, agitação de 400 rpm e glicose e xilose como fontes de carbono (30/70%). Ambos os cultivos foram realizados em triplicata e encerrados no início da fase estacionaria. A biomassa do final dos experimentos foi liofilizada e transesterificada (Lewis *et al.*, 2000).

O perfil dos FAMES foi analisado em um sistema de cromatografia gasosa Varian Star 3600CX com detector por inozação de chama (FID), coluna DB-23 de 30 m por 0.53 mm J&W Scientific e a identificação dos FAMES foi confirmada em um cromatógrafo gasoso com detector de massas GC-2010 (Shimatzu) utilizando uma coluna capilar Stabilwax, 30 m, 0,25 mm I.D., 0,25 µm. Para a eletroinozação foi utilizado 70 eV. Em ambos os procedimentos, hélio foi a fase móvel utilizada com pressão de 15 psi, split 1/100, 250 °C no injetor e 300 °C no detector. A rampa de temperatura para a coluna foi: 50°C por 2min, gradiente de 10 °C/min até atingir 180 °C, 5 minutos em espera à 180 °C, gradiente de 5 °C/min até atingir 240 °C, totalizando 32 minutos de corrida cromatográfica. O volume injetado para cada análise foi de 1 µL. A partir do perfil dos FAMES foram estimados 6 parâmetros que regulamentam a qualidade do biodiesel, como detalhado na Tabela 1.

Tabela 1: Parâmetros para análise de qualidade do Biodiesel.

Parâmetro	Eq.	Parâmetro	Eq.
$NC = 46.3 + \frac{5458}{\sum \frac{560. \%ME}{MM_{ME}}} - 0.225II$	(17)	$\Delta H_c = \sum \frac{\Delta H_{C_ME} \%ME}{100}$	(18)
$II = \sum \frac{254. N_{L=}. \%ME}{MM_{ME}}$	(19)	$OSI = \sum \frac{OSI_{ME} \%ME}{100}$	(20)
$\rho = \sum \frac{\rho_{ME} \%ME}{100}$	(21)	$\ln(v) = \sum \frac{\ln(v_{ME}) \%ME}{100}$	(22)

Fonte: (Gopinath *et al.*, 2009, Pereyra-Irujo *et al.*, 2009, Pratas *et al.*, 2011).

3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

A análise do perfil de ácidos graxos está apresentada na Tabela 2. Os FAMES acumulados nas amostras da *C. vulgaris* foram C16:0, C16:1, C16:2, C16:3, C18:0, C18:1, C18:2, e C18:3 e outros em menor quantidade. Nas amostras da *L. starkeyi*, os FAMES encontrados foram C16:0, C16:1, C18:0, C18:1 e C18:2. Os FAMES comumente encontrados no biodiesel são C16:0, C18:0, C18:1, C18:2 e C18:3 (Knothe, 2005) e correspondem a aproximadamente 91 e 97% dos FAMES encontrados nas amostras da *C. vulgaris* e da *L. starkeyi*, respectivamente.

As Tabelas 3 e 4 contêm, respectivamente, as propriedades dos FAMES coletadas da literatura e os resultados da predição dos parâmetros de qualidade comparados com as normas americana, européia e brasileira. Os valores preditos de CN, ρ , ν , ΔH_C , OSI, II se adéquam aos limites impostos pelas 3 normas em ambos os casos. A vantagem do biodiesel da *L. starkeyi* está na ausência de C18:3, que é limitado em 12% pela norma EN 14214. Já a *C. vulgaris* apresenta vantagem em relação à mitigação de dióxido de carbono associada a produção de biocombustível por se tratar de um processo fotossintético.

Tabela 2: Perfil de FAMES da *Chlorella vulgaris* e *Lipomyces starkeyi*.

Cultivo	FAMES (%)												
	C5:0	C16:0	C16:1	C16:2	C16:3	C18:0	C18:1	C18:2	C18:3	Others	SFA	MUFA	PUFA
Chlorella	0,51	25,18	0,81	1,36	5,32	5,99	40,89	6,12	12,72	1,11	31,68	41,70	25,52
Lipomyces	0,00	36,23	2,79	0,00	0,00	9,72	47,79	3,42	0,00	0,05	45,95	50,58	3,42

Tabela 3: Propriedades dos FAMES coletadas da literatura.

FAME	Formula	MW (g/mol)	ρ (kg/m ³)	ν (mm ² .s)	ΔH_C (kJ/g)	OSI (h)	CN
C5:0	C ₆ H ₁₀ O ₃	130,14	875 ^b	0,53 ^f	28,08 ^f	>40 ^e	17,8 ^f
C16:0	C ₁₇ H ₃₄ O ₂	270,46	852 ^b	4,32 ^a	39,47 ^a	>40 ^c	74,5 ^a
C16:1	C ₁₇ H ₃₂ O ₂	268,44	875 ^b	3,67 ^c	39,32 ^a	2,1 ^c	51 ^a
C16:2	C ₁₇ H ₃₀ O ₂	266,42	900 ^b	3,08 ^d	39,14 ^d	0,49 ^d	33,1 ^d
C16:3	C ₁₇ H ₂₈ O ₂	264,10	911 ^b	2,59 ^d	38,86 ^d	0,15 ^d	20,7 ^d
C18:0	C ₁₉ H ₃₈ O ₂	298,51	850 ^b	4,74 ^a	40,10 ^a	>40 ^c	101 ^a
C18:1	C ₁₉ H ₃₆ O ₂	296,49	874 ^b	4,51 ^a	39,93 ^a	2,50 ^c	59,3 ^a
C18:2	C ₁₉ H ₃₄ O ₂	294,48	889 ^b	3,27 ^a	39,72 ^a	1,00 ^c	42,2 ^a
C18:3	C ₁₉ H ₃₂ O ₂	292,46	895 ^b	3,14 ^a	39,37 ^a	0,20 ^c	22,7 ^a

Fonte: ^a (Knothe, 2005); ^B (Lapuerta *et al.*, 2010); ^c (Moser, 2009); ^d proporção geométrica entre os valores de C18:0 a C18:3 aplicados a C16:0 to C16:3, ^e (Moser, 2009), ^f C5:0 propriedades estimadas a partir de C4:0.

Tabela 4: Comparação dos resultados com os limites estabelecidos pelas normas.

	ρ (kgm ⁻³)	ν (mm ² .s)	ΔH_C (kJ.g ⁻¹)	OSI (h)	CN	II (g ₁₂ /100g)	%C18:3
<i>C. vulgaris</i>	863	3,9	39,2	13,8	53	97	12,72
<i>L. starkeyi</i>	864	4,4	39,7	12,5	63	49	0,00
ASTM D6751	-	1,9-6,0	-	-	Min 47	-	-
EN 14214/EN14213	860-900	3,5-5,0	35	Min 6 e 4	Min 51	Max 120/130	12
ANP 255/2003	-	-	-	-	Min 45	-	-

4. CONCLUSÕES

O perfil de ácidos graxos e a predição de qualidade de biodiesel foram avaliados a partir de amostras de *C. vulgaris* e *L. starkeyi*. Em ambos os casos, o perfil de ácidos graxos apresentou os compostos comumente encontrados no biodiesel. A vantagem do biodiesel da *L. starkeyi* está na ausência de C18:3, que é limitado em 12% pela norma EN 14214. Já a *C. vulgaris* apresenta

vantagem em relação à mitigação de dióxido de carbono associada a produção de biocombustível por se tratar de um processo fotossintético. O resultados da predição de qualidade se enquadraram nas três normas avaliadas, evidenciando o potencial do óleo de *C. vulgaris* e da *L. starkeyi* como matérias primas para produção de biodiesel.

5. NOMENCLATURA

CN	Número de Cetano	-	II	índice de iodo	g _{I2} /100g
ΔH_C	Calor de combustão	kJ/g	$\Delta H_{C,ME}$	Calor de combustão do éster	kJ/g
MM_{ME}	Massa molecular do éster	g/mol	%ME	Porcentagem do éster metílico	-
OSI	Índice de estabilidade à oxidação	h	OSI _{ME}	Índice de estabilidade a oxidação do éster	H
ρ	Densidade	kg/m ³	ρ_{ME}	Densidade do éster	kg/m ³
ν	Viscosidade	mm ² .s	ν_{ME}	Viscosidade do éster	mm ² .s

6. REFERENCIAS

- AGEITOS, J.M.; VALLEJO, J.A.; CRESPO, P.V.; VILLA, T.G. Oily yeasts as oleaginous cell factories. *Appl Microbiol. Biotechnol.*, v. 90, p. 1219-1227, 2011.
- GOPINATH, A.; PUHAN, S.; NAGARAJAN, G. Relating the cetane number of biodiesel fuels to their fatty acid composition: A critical study. *Proceedings of the Institution of Mechanical Engineers, Part D: J. Automobile Eng.*, v. 223, p. 565-583, 2009.
- KNOTHE, G.; GERPEN, J.V.; KRAHL, J. The biodiesel Handbook, AOCS Press, 2005.
- LAPUERTA, M.; RODRÍGUEZ-FERNÁNDEZ, J.; ARMAS, O. Correlation for the estimation of the density of fatty acid esters fuels and its implications. A proposed Biodiesel Cetane Index. *Chem. Phys. Lipids*, v. 163, p. 720-727, 2010.
- LEWIS, T.; NICHOLS, P. D.; MCMEEKIN, T. A. Evaluation of extraction methods for recovery of fatty acids from lipid-producing microheterotrophs. *J. Microbiol. Meth.*, v. 43, p. 107-116, 2000.
- MENG, S.; YANG, J.; XU, X.; ZHANG, L.; NIE, Q.; XIAN, M. Review: Biodiesel production from oleaginous microorganisms. *Renew. Energ.*, v. 34, p. 1-5, 2009.
- MOSER, B. Biodiesel production, properties, and feedstocks. *In Vitro Cell. Dev-Pl.*, v. 45, p. 229-266, 2009.
- MOSER, B. Comparative Oxidative Stability of Fatty Acid Alkyl Esters by Accelerated Methods. *J. Am. Oil Chem. Soc.*, v. 86, p. 699-706, 2009.
- PEREYRA-IRUJO, G. A.; IZQUIERDO, N. G.; COVI, M.; NOLASCO, S. M.; QUIROZ, F.; AGUIRREZÁBAL, L. A. N. Variability in sunflower oil quality for biodiesel production: A simulation study. *Biomass Bioenerg.*, v. 33, p. 459-468, 2009.
- PRATAS, M. J.; S.V.D., F.; OLIVEIRA, M. B.; MONTEIRO, S. C.; LIMA, A. S.; COUTINHO, J. A. P. Biodiesel Density: Experimental Measurements and Prediction Models. *Energ. Fuels*, v. 25, p. 2333-2340, 2011.
- RAMOS, M. J.; FERNÁNDEZ, C. M.; CASAS, A.; RODRÍGUEZ, L.; PÉREZ, Á. Influence of fatty acid composition of raw materials on biodiesel properties. *Bioresource Technol.*, v. 100, p. 261-268, 2009.
- YEN, H.W., HU, I.C., CHEN, C.Y., HO, S.H., LEE, D.J., CHANG, J.C. Microalgae-based biorefinery – From biofuels to natural products. *Bioresource Technol.*, 2012. <http://dx.doi.org/10.1016/j.biortech.2012.10.099>

Disponibilidade de luz no centro de fotobiorreatores

L.M.C.F. LACERDA¹, E.M. REIS¹ e T.T. FRANCO¹

¹ Universidade Estadual de Campinas, Faculdade de Engenharia Química
E-mail para contato: franco.feq@gmail.com

RESUMO – Microalgas podem ser utilizadas na produção de biocombustíveis, proteínas, pigmentos, enzimas, moléculas bioativas, dentre outros. Quando cultivadas fotossinteticamente, a disponibilidade de luz é fundamental agindo como a principal fonte de energia para o crescimento celular. Neste trabalho, intensidades luminosas de 108 e 420 $\mu\text{mol.m}^{-2}.\text{s}^{-1}$ foram aplicadas em fotobiorreatores do tipo coluna de bolhas e a disponibilidade de luz foi estimada, ao longo dos cultivos, em função da concentração celular e de pigmentos. Após 96 h, ambos os cultivos apresentaram concentrações celulares inferiores a 2 g.L⁻¹ e perdas de mais de 85% de luminosidade no centro dos reatores, evidenciando que esse é um dos assuntos em que os esforços de biotecnologia microalgal devem ser empregados.

1. INTRODUÇÃO

Células de microalgas cultivadas em fotobiorreatores ficam expostas à elevada intensidade luminosa próxima às paredes enquanto que a região central apresenta baixa ou nenhuma luz (Richmond, 2004). O gradiente de luz formado nos biorreatores é função de diversos fatores (Eriksen, 2008): i) luz incidente que corresponde à quantidade de luz disponível; ii) tipo e as dimensões do reator que definem o caminho que a luz irá atravessar até chegar ao seu centro; iii) densidade celular que está relacionada ao espalhamento da luz causado pelas células; iv) quantidade de pigmentos nas células que corresponde a variações na coloração do meio de cultivo; v) agitação por meio da introdução de bolhas de ar que pode aumentar a penetração da luz no interior do reator.

Diversos modelos têm sido utilizados para fornecer descrições precisas de gradientes de luz, sendo os mais completos os que assumem a distribuição difusa da luz e levam em consideração a geometria do reator, fonte de luz, absorção da luz pelos pigmentos fotossintetizantes e o espalhamento da luz pela presença de células e outras partículas sólidas (Acien Fernández *et al.*, 1999, Berberoglu *et al.*, 2007, Eriksen, 2008).

Neste trabalho, a disponibilidade de luz no centro do reator foi estimada pela relação Beer-Lambert utilizando como parâmetros a concentração celular, concentração de pigmentos no interior das células, diâmetro do reator e do ângulo de incidência da luz.

2. MATERIAL E MÉTODOS

2.1 Micro-organismo e cultivo

A microalga *Chlorella vulgaris* (CPCC90) foi cultivada em reatores do tipo coluna de bolhas de 8 cm de diâmetro, contendo 3 L de meio sintético BBM (Stein, 1973), 0,1 g.L⁻¹ de

inoculo inicial, 26 °C, 108 e 420 $\mu\text{mol.m}^{-2}.\text{s}^{-1}$ de luminosidade (24 h por dia), agitação de 1 VVM de ar contendo 8,05% de CO_2 . Os cultivos foram monitorados a cada 12 h e realizados em triplicata.

2.2 Métodos analíticos

A concentração celular foi avaliada gravimetricamente pela filtração de 20 mL de meio de cultura em filtro de 0,22 μm (Millipore) e secagem à 60 °C por 24 h. Os filtros utilizados na gravimetria foram acondicionados em tubos de ensaio âmbar contendo 10 mL de acetona 90%, homogeneizados por 5 minutos em vortex, refrigerados por 24 h à 8 °C, centrifugados à 5000 rpm por 20 minutos e avaliados espectrofotometricamente (Espectrofotômetro digital UV-Vis, Genesys-10 UV). Todas as etapas foram realizadas na ausência de luz. As equações abaixo foram utilizadas para determinar as concentrações das clorofilas 'a' e 'b' e carotenóides totais, bem como estimar a intensidade luminosa no centro biorreator (Acién Fernández *et al.*, 2001, García-Malea *et al.*, 2005, Wu *et al.*, 2012):

$$C_a (\mu\text{g/mL}) = 11,85 A_{664} - 1,54 A_{647} - 0,086 A_{630} \quad (2)$$

$$C_b (\mu\text{g/mL}) = 21,03 A_{647} - 5,43 A_{664} - 2,66 A_{630} \quad (3)$$

$$C_{(x+c)} (\mu\text{g/mL}) = (1000 A_{470} - 1,9C_a - 63,14C_b) / 214 \quad (4)$$

$$I_{av} = \frac{I_0 \left[1 - \exp \left(1 - \exp \left(-X \frac{d}{\cos \theta} (0,086 + 0,0065(C_a + C_b) - 0,016C_{(c+x)}) \right) \right) \right]}{(0,086 + 0,0065(C_a + C_b) - 0,016C_{(c+x)}) X \frac{d}{\cos \theta}} \quad (5)$$

3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

Diferentes intensidades luminosas (108 e 420 $\mu\text{mol.m}^{-2}.\text{s}^{-1}$) foram utilizadas para avaliar a disponibilidade de luz no interior do reator em função, principalmente, da concentração celular e de pigmentos ao longo dos experimentos apresentados na Figura 1. Inicialmente observou-se aproximadamente 5,1 $\mu\text{gC}_a/\text{mg}_{\text{biomassa}}$, 1,6 $\mu\text{gC}_b/\text{mg}_{\text{biomassa}}$ e 1,7 $\mu\text{gC}_{(c+x)}/\text{mg}_{\text{biomassa}}$, razão C_a/C_b e razão $C_a/C_{(c+x)} \sim 3:1$. Pode-se notar que, no ensaio com 108 $\mu\text{mol.m}^{-2}.\text{s}^{-1}$ a razão C_a/C_b permaneceu entre 3:1 e 2:1 durante todo o cultivo. No cultivo com 420 $\mu\text{mol.m}^{-2}.\text{s}^{-1}$ houve uma inversão na razão $C_a/C_b = 1:2$ associada ao declínio da concentração das clorofilas e alteração da coloração do cultivo, passando de verde escuro para verde-amarelado. Segundo Richmond (2004), esse comportamento pode ser explicado pela elevada intensidade luminosa ao qual o cultivo foi submetido.

Foi considerado decaimento exponencial da disponibilidade de luz em função da distância entre a parede e o centro do fotobiorreator (Mirón *et al.*, 1999) com a criação de três zonas de iluminação. Sabendo que, em espécies de *Chlorella*, o ponto de saturação ocorre em torno de 120 $\mu\text{mol.m}^{-2}.\text{s}^{-1}$ e o ponto de compensação em torno de 20 $\mu\text{mol.m}^{-2}.\text{s}^{-1}$ (Lloyd *et al.*, 1977), temos: i) a primeira zona ocorrendo fotoinibição e se estendendo até o ponto com 120 $\mu\text{mol.m}^{-2}.\text{s}^{-1}$ de intensidade luminosa; ii) a segunda zona ocorrendo fotolimitação de 120 a 20 $\mu\text{mol.m}^{-2}.\text{s}^{-1}$; iii) a terceira zona ocorrendo crescimento negativo devido a falta de luz ($<20 \mu\text{mol.m}^{-2}.\text{s}^{-1}$).

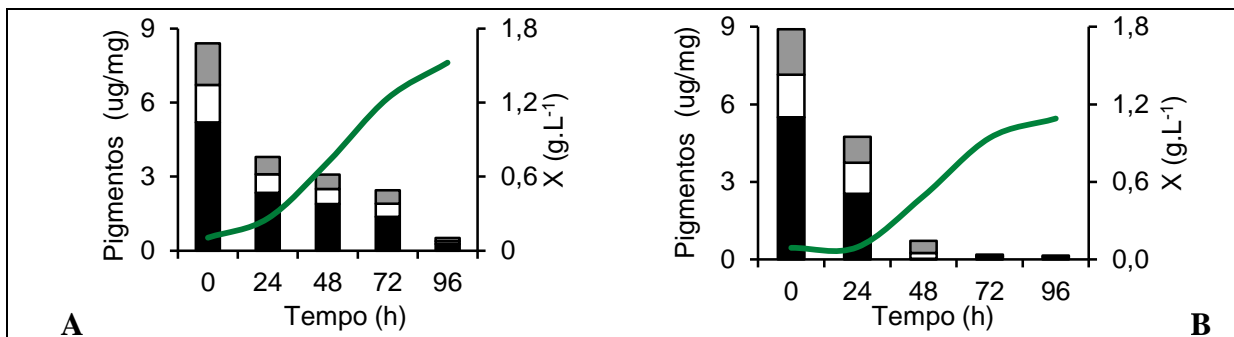


Figura 1: Perfil de pigmentos e concentração celular.

(A - $108 \mu\text{mol.m}^{-2}.\text{s}^{-1}$, B - $420 \mu\text{mol.m}^{-2}.\text{s}^{-1}$ [\blacksquare ; C_a \blacksquare ; C_b \square ; C_(e+x) \square]).

Os valores estimados de disponibilidade de luz no centro do reator estão apresentados na Figura 2, podendo-se perceber que com a concentração de $0,1 \text{ g.L}^{-1}$ (início dos experimentos), o centro do reator deixa de receber aproximadamente 30% da intensidade luminosa incidente na superfície. Ao longo do tempo de cultivo, essa perda chegou a 90% ($108 \mu\text{mol.m}^{-2}.\text{s}^{-1}$ e $1,6 \text{ g.L}^{-1}$) e 85% ($420 \mu\text{mol.m}^{-2}.\text{s}^{-1}$ e $1,2 \text{ g.L}^{-1}$) da luz incidente. Nesse sentido, estima-se que houve a criação das zonas de fotolimitação (108 a $20 \mu\text{mol.m}^{-2}.\text{s}^{-1}$) e de crescimento negativo ($>20 \mu\text{mol.m}^{-2}.\text{s}^{-1}$) para o experimento de $108 \mu\text{mol.m}^{-2}.\text{s}^{-1}$ e das zonas de fotoinibição (420 a $120 \mu\text{mol.m}^{-2}.\text{s}^{-1}$) e fotolimitação (120 a $60 \mu\text{mol.m}^{-2}.\text{s}^{-1}$) para o experimento de $420 \mu\text{mol.m}^{-2}.\text{s}^{-1}$.

A variável que deve ser otimizada no aumento de escala de fotobiorreatores é a produtividade em biomassa que é função da taxa crescimento celular e está correlacionada com intensidade de luz disponível (Acién Fernandez *et al.*, 2001). Nesse sentido, estudos de disponibilidade de luz no interior de reatores em função da concentração celular são importantes na otimização de cultivos fotossintéticos auxiliando o estabelecimento das dimensões do reator para minimizar a ocorrência de zonas de crescimento negativo e fotoinibição.

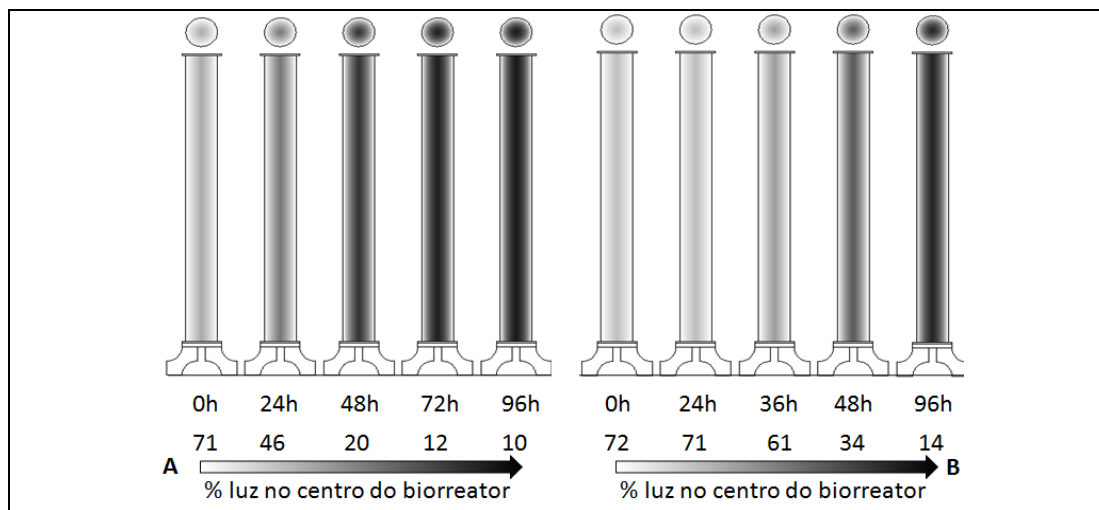


Figura 2: Variação da disponibilidade de luz no interior do fotobiorreator.

(A - $108 \mu\text{mol.m}^{-2}.\text{s}^{-1}$, B - $420 \mu\text{mol.m}^{-2}.\text{s}^{-1}$)

4. CONCLUSÕES

Intensidades luminosas de 108 e 420 $\mu\text{mol.m}^{-2}.\text{s}^{-1}$ foram aplicadas no cultivo da *C. vulgaris* em fotobiorreatores. A disponibilidade de luz no centro do reator foi estimada, ao longo de cultivos, em função da concentração celular e de pigmentos. Observou-se que, após 96 h e com menos de 2 g.L^{-1} de biomassa, as perdas de luminosidade no centro do reator foram superiores a 85%. Os resultados evidenciaram que esse é um dos assuntos em que esforços de biotecnologia microalgal devem ser empregados para a otimização dos cultivos.

5. NOMENCLATURA

A	Absorbância	-	I_0	Luz inc. na superfície	$\mu\text{mol.m}^{-2}.\text{s}^{-1}$
$C_a; C_b$	Clorofilas 'a' e 'b'	$\mu\text{g/mg}$	I_{av}	Luz no interior do reator	$\mu\text{mol.m}^{-2}.\text{s}^{-1}$
$C_{(C+x)}$	Carotenóides totais	$\mu\text{g/mg}$	X	Concentração celular	g.L^{-1}
D	Diâmetro do reator	m	θ	Ângulo de inc. da luz	Rad

6. REFERENCIAS

- ACIÉN FERNÁNDEZ, F. G.; FERNÁNDEZ SEVILLA, J. M.; SÁNCHEZ PÉREZ, J. A.; MOLINA GRIMA, E. e CHISTI, Y. Airlift-driven external-loop tubular photobioreactors for outdoor production of microalgae: assessment of design and performance. *Chem. Eng. Sci.*, v. 56, p. 2721-2732, 2001.
- ACIÉN FERNÁNDEZ, F. G.; GARCÍA CAMACHO, F. e CHISTI, Y. Photobioreactors: light regime, mass transfer, and scaleup. *Prog. Ind. M.*, v. 35, p. 231-247, 1999.
- BAI, M.-D.; CHENG, C.-H.; WAN, H.-M. e LIN, Y.-H. Microalgal pigments potential as byproducts in lipid production. *J. Taiwan Ins. Chem. E.*, v. 42, p. 783-786, 2011.
- BERBEROGLU, H.; YIN, J. e PILON, L. Light transfer in bubble sparged photobioreactors for H_2 production and CO_2 mitigation. *Int. J. Hydrogen Energy*, v. 32, p. 2273-2285, 2007.
- ERIKSEN, N. T. The technology of microalgal culturing. *Biotechnol Lett*, v. 30, p. 1525-1536, 2008.
- GARCÍA-MALEA, M. C.; BRINDLEY, C.; RÍO, E. D.; ACIÉN, F. G.; FERNÁNDEZ, J. M. e MOLINA, E. Modelling of growth and accumulation of carotenoids in *Haematococcus pluvialis* as a function of irradiance and nutrients supply. *Biochem. Eng. J.*, v. 26, p. 107-114, 2005.
- LLOYD, N. D. H.; CANVIN, D. T.; CULVER, D. A. Photosynthesis and Photorespiration in Algae. *Plant Physiol.*, v. 59, p. 936-940, 1977.
- MIRÓN, A. S.; GÓMEZ, A. C.; CAMACHO, F. G.; GRIMA, E. M. e CHISTI, Y. Comparative evaluation of compact photobioreactors for large-scale monoculture of microalgae. *Prog. Ind. M.*, v. 35, p. 249-270, 1999.
- RICHMOND, A. Handbook of microalgal culture : biotechnology and applied phycology, Blackwell Science Ltd, 2004.
- STEIN, J. R. Handbook of phycological methods. Culture methods and growth measurements, Cambridge University Press, London, 1973.
- WU, Y.-H.; YU, Y.; LI, X.; HU, H.-Y. e SU, Z.-F. Biomass production of a *Scenedesmus* sp. under phosphorous-starvation cultivation condition. *Bioresource Technol.*, v. 112, p. 193-198, 2012.

CAPÍTULO 12

ANEXO

Estado da arte do cultivo de microalgas no LEBBPOR

O cultivo de microalgas no laboratório teve início no ano de 2005. Desde então, inúmeros estudos foram realizados: i) a cianobactéria *Aphanothece microscopica* Nagëli foi avaliada em termos de crescimento celular, seqüestro de dióxido de carbono e tratamento de efluentes líquidos e gasosos de refinarias de petróleo. ii) a *Chlorella vulgaris* foi avaliada em termos de crescimento celular, mitigação de dióxido de carbono, acúmulo de lipídios e geração de compostos orgânicos voláteis; iii) Cultivos heterotróficos da *Chlorella vulgaris* também foram realizados envolvendo diferentes fontes de carbono orgânico, sistemas de cultivo e regimes de operação; iv) métodos separação da biomassa e extração e transesterificação de óleos de microalgas também foram avaliados. A partir desses estudos, os seguintes textos foram publicados:

Capítulos de livros:

- 1) JACOB-LOPES, E. ; FRANCO, T. T. . Microalgae-based systems for carbon dioxide sequestration and industrial biorefineries. In: **Maggie Momba and Faizal Bux. (Org.). Biomass**. Vienna: Sciyo, 2010, v. 1, p. 135-145.

Artigos em revistas internacionais:

- 1) JACOB-LOPES, E.; LACERDA, L. M. C. F.; FRANCO, T. T. Biomass production and carbon dioxide fixation by *Aphanothece microscopica* Nagëli in a bubble column photobioreactor. **Biochemical Engineering Journal**, v. 40, n. 1, p. 27-34, 2008.
- 2) JACOB-LOPES, E.; SCOPARO, C. H. G.; FRANCO, T. T. Rates of CO₂ removal by *Aphanothece microscopica* Nagëli in tubular photobioreactors. **Chemical Engineering and Processing: Process Intensification**, v. 47, n. 8, p. 1365-1373, 2008.
- 3) JACOB-LOPES, E.; SCOPARO, C. H. G.; LACERDA, L. M. C. F.; FRANCO, T. T. Effect of light cycles (night/day) on CO₂ fixation and biomass production by microalgae in photobioreactors. **Chemical Engineering and Processing: Process Intensification**, v. 48, n. 1, p. 306-310, 2009.
- 4) JACOB-LOPES, E.; REVAH, S.; HERNÁNDEZ, S.; SHIRAI, K.; FRANCO, T. T. Development of operational strategies to remove carbon dioxide in photobioreactors. **Chemical Engineering Journal**, v. 153, n. 1-3, p. 120-126, 2009.

- 5) FRANCISCO, Ě. C.; JACOB-LOPES, E.; NEVES, D. B.; FRANCO, T. T. Microalgae as feedstock for biodiesel production: carbon dioxide sequestration, lipid production and biofuel quality. **New Biotechnology**, v. 25, n. Supplement 1, p. S278-S279, 2009.
- 6) JACOB-LOPES, E.; GIMENES SCOPARO, C. H.; QUEIROZ, M. I.; FRANCO, T. T. Biotransformations of carbon dioxide in photobioreactors. **Energy Conversion and Management**, v. 51, n. 5, p. 894-900, 2010.
- 7) LACERDA, L. M. C. F.; QUEIROZ, M. I.; FURLAN, L. T.; LAURO, M. J.; MODENESI, K.; JACOB-LOPES, E.; FRANCO, T. T. Improving refinery wastewater for microalgal biomass production and CO₂ biofixation: Predictive modeling and simulation. **J Petrol Sci Eng**, v. 78, n. 3-4, p. 679-686, 2011.

Artigos/resumos publicados em congressos nacionais e internacionais:

- 1) LACERDA, M.C.F.L.; FRANCO, T. T. Optimizing microalgae growth and CO₂ mitigation. In **3rd International Conference on Algal Biomass, Biofuels and Bioproducts**, Toronto, 2013.
- 2) VIDOTTI, A.D.; LACERDA, M.C.F.L.; FRANCO, T. T. Substrate inhibition of *Chlorella vulgaris* by acetate in heterotrophic culture. In **3rd International Conference on Algal Biomass, Biofuels and Bioproducts**, Toronto, 2013.
- 3) COELHO, R.S., FRANCO, T.T. High biomass productivity from substrate sensitive microalgae. In **3rd International Conference on Algal Biomass, Biofuels and Bioproducts**, Toronto, 2013.
- 4) VIDOTTI, A.D.S., LACERDA, L.M.C.F., FRANCO, T.T. Cultivo autotrófico x heterotrófico – Parte 1: Crescimento celular e acúmulo de lipídios. In: **XIX Simpósio Nacional de Bioprocessos - SINAFERM**, 2013, Foz do Iguaçu.
- 5) LACERDA, L.M.C.F., VIDOTTI, A.D.S., PIOVANI, M.R., FRANCO, T.T. Cultivo autotrófico x heterotrófico – Parte 2: Predição da qualidade do biodiesel. In: **XIX Simpósio Nacional de Bioprocessos - SINAFERM**, 2013, Foz do Iguaçu.
- 6) LACERDA, L.M.C.F., REIS, E.M., ANSCHAU, A., PIOVANI, M.R., FRANCO, T.T. Produção de biodiesel a partir de microalgas e leveduras. In: **XIX Simpósio Nacional de Bioprocessos - SINAFERM**, 2013, Foz do Iguaçu.
- 7) LACERDA, L.M.C.F., FRANCO, T.T. Disponibilidade de luz no centro de fotobiorreatores. In: **XIX Simpósio Nacional de Bioprocessos - SINAFERM**, 2013, Foz do Iguaçu.

- 8) LACERDA, L. M. C. F.; FRANCO, T. T. Optimal coagulant doses to promote elevated biomass recovery efficiency. In 35th **Symposium on Biotechnology for Fuels and Chemicals**, Portland, 2013.
- 9) COELHO, R.S., VIDOTTI, A.D.S., PIOVANI, M.R., FRANCO T.T. High cell density culture of microalgae sensitive to substrate inhibition. In 35th **Symposium on Biotechnology for Fuels and Chemicals**, Portland, 2013.
- 10) LACERDA, L. M. C. F.; VIDOTTI, A.D.; LOPES, E.J; FRANCO, T. T. Modelagem de crescimento da microalga *Chlorella vulgaris*. In: **XVIII Congresso Brasileiro de Engenharia Química - COBEQ**, 2012, Búzios.
- 11) LACERDA, L. M. C. F.; SCOPARO, C. H. ; PIOVANI, M.R.; VIDOTTI, A.D.; LOPES, E.J; FRANCO, T. T. Photobioreactors: biomass production and CO₂ mitigation. IN **1st BBEST – Brazilian BioEnergy Science and Technology Conference**. BBEST, 2011, CAMPOS DO JORDÃO.
- 12) PIOVANI, M. R., LACERDA, L. M. C. F.; RIBEIRO, M. C. R.; M.R.; VIDOTTI, A.D.; FRANCISCO, E. C.; LOPES, E.J; FRANCO, T. T. From oil refinery to microalgal biorefinery. IN **1st BBEST – Brazilian BioEnergy Science and Technology Conference**. BBEST, 2011, CAMPOS DO JORDÃO.
- 13) SCOPARO, C. H. ; LACERDA, L. M. C. F.; LOPES, E.J; FRANCO, T. T. Análise da viabilidade energético ambiental da conversão de dióxido de carbono por microalgas em fotobiorreatores . In: **XVIII Congresso Brasileiro de Engenharia Química - COBEQ**, 2010, Foz do Iguacu. 2010.
- 14) PIOVANI, M. R. ; AUGUSTO, F. ; JACOB-LOPES, E. ; FRANCO, T. T. . Carbon footprint in photobioreactors. In: **2010 Conference on Biofiltration for Air Pollution Control**, 2010, Washington. 2010 Conference on Biofiltration for Air Pollution Control, 2010.
- 15) LACERDA, L. M. C. F.; LOPES, E.J; FRANCO, T.T. Modelagem matemática de dióxido de carbono em fotobiorreatores. In: **XVII Simpósio nacional de Bioprocessos – SINAFERM**, Natal, 2009.
- 16) LACERDA, L. M. C. F.; LOPES, E.J; FRANCO, T.T. Avaliação de modelos matemáticos no crescimento de microalgas para a produção de biomassa e fixação de dióxido de carbono. In: **XVII Simpósio nacional de Bioprocessos – SINAFERM**, Natal, 2009.
- 17) FRANCISCO, E. C. ; JACOB-LOPES, E. ; NEVES, D.J.B. ; FRANCO, T. T. . Propriedades do biodiesel obtido a partir da microalga *Chlorella vulgaris* (UTCC90). In: **XVII Simpósio Nacional de Bioprocessos - SINAFERM**, 2009, Natal
- 18) FRANCISCO, E. C. ; JACOB-LOPES, E. ; NEVES, D.J.B. ; FRANCO, T. T. . Seleção de microalgas para a produção de matérias graxas e fixação de dióxido de carbono. In: **XVII Simpósio Nacional de Bioprocessos - SINAFERM**, 2009, Natal.

- 19) LOPES, E.J ; LACERDA, L. M. C. F.; REVAH, S.; HERNÁNDEZ, S.; SHIRAI, K.; FRANCO, T. T. . Comparação do desempenho de reatores de coluna de bolhas e air-lift para seqüestro de dióxido de carbono. In: **XVII Congresso Brasileiro de Engenharia Química**, 2008, Recife.
- 20) SCOPARO, C. H. ; JACOB-LOPES, E. ; FRANCO, T. T. . Efeito da temperatura na remoção de CO₂ por microalgas. In: **VII Congresso Brasileiro de Engenharia Química em Iniciação Científica**, 2008, São Carlos.
- 21) JACOB-LOPES, E. ; SHIRAI, K. ; HERNANDEZ, S. ; REVAH, S. ; FRANCO, T. T. . Comparação do desempenho de reatores de coluna de bolhas e air-lift para seqüestro de dióxido de carbono. In: **XVII Congresso Brasileiro de Engenharia Química**, 2008, Recife.
- 22) JACOB-LOPES, E. ; HERNANDEZ, S. ; SHIRAI, K. ; REVAH, S. ; FRANCO, T. T. . Reatores em batelada com recirculação do ar para o seqüestro biológico de CO₂. In: **XVII Congresso Brasileiro de Engenharia Química**, 2008, Recife.
- 23) JACOB-LOPES, E. ; SCOPARO, C. H. ; FRANCO, T. T. . Constantes da velocidade de reação de dióxido de carbono em fotobiorreatores. In: **XVI Simpósio Nacional de Bioprocessos - SINAFERM**, 2007, Curitiba.
- 24) JACOB-LOPES, E. ; LACERDA, L.M.CF. ; FRANCO, T. T. . Biofixação de dióxido de carbono por *Aphanothece microscopica Nægeli* em fotobiorreatores. In: **XVI Simpósio Nacional de Bioprocessos - SINAFERM**, 2007, Curitiba.
- 25) LACERDA, L. M. C. F.; LOPES, E.J ; FRANCO, T. T. .Influência da temperatura no cultivo da cianobactéria *Aphanothece microscópica Nagueli* em fotobiorreatores. In: **XV Congresso Interno de Iniciação Científica da UNICAMP**, Campinas, 2007.
- 26) LACERDA, L. M. C. F.; LOPES, E.J ; FRANCO, T. T. . Influência da luminosidade no cultivo da cianobactéria *Aphanothece microscopica Nægeli* em fotobiorreatores. In: **VII Congresso Brasileiro de Engenharia Química em Iniciação Científica**, 2008, São Carlos.
- 27) LOPES, E.J; SCOPARO, C. H. ; LACERDA, L. M. C. F. ; FRANCO, T. T. .Análise da cinética de remoção de dióxido de carbono em fotobiorreatores pelo método das velocidades iniciais. In: **24º Congresso Brasileiro de Engenharia Sanitária e Ambiental**, 2007, Belo Horizonte.
- 28) LOPES, E.J.; SCOPARO, C. H. ; LACERDA, L. M. C. F. ; FRANCO, T. T. . Perfis de absorção/dessorção de CO₂ em fotobiorreatores. In: **V Workshop Internacional Brasil-Japão**, 2007, Campinas.